

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平8-502163

(43)公表日 平成8年(1996)3月12日

(51)Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号	F I
C 12 N 15/09	Z NA		
A 61 K 39/36	A B F	9284-4C	
C 07 K 7/08			
14/415		8318-4H	
		9281-4B	C 12 N 15/00 Z NA A
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全149頁)	最終頁に統く

(21)出願番号 特願平6-503269
(22)出願日 平成5年(1993)1月15日
(85)翻訳文提出日 平成7年(1995)3月1日
(86)国際出願番号 PCT/US93/00139
(87)国際公開番号 WO94/01560
(87)国際公開日 平成6年(1994)1月20日
(31)優先権主張番号 07/938,990
(32)優先日 1992年9月1日
(33)優先権主張国 米国(US)
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE), AU, CA, JP, KR, NZ,
US

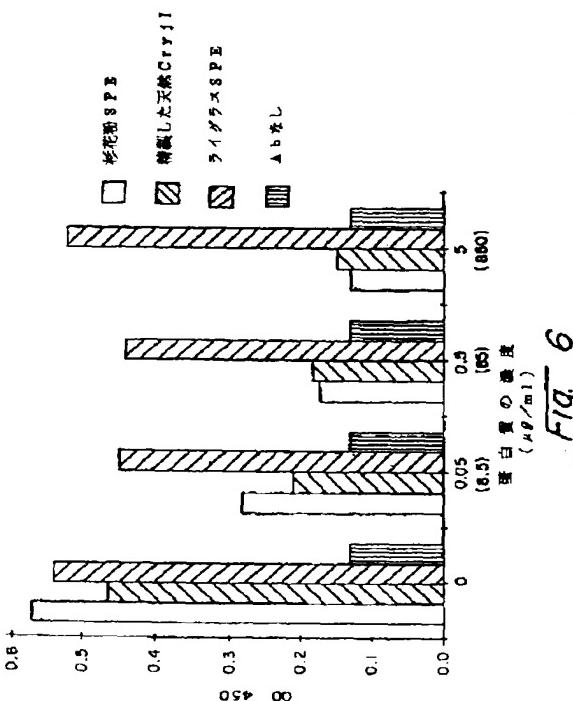
(71)出願人 イミュロジック ファーマスティカル
コーポレーション
アメリカ合衆国 02154 マサチューセッ
ツ, ウォルサム, リンカン ストリート
610
(72)発明者 グリフィス, アーウィン ジェイ.
アメリカ合衆国 01864 マサチューセッ
ツ, ノース リーディング, サウスウッド
クロード 13
(74)代理人 弁理士 倉内 基弘 (外1名)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 杉花粉由来のアレルゲン性蛋白質及びペプチド

(57)【要約】

本発明は、杉花粉アレルゲンCryjIの単離したペプチドを提供する。この発明の範囲内のペプチドは、CryjIの少なくとも1つのT細胞エピトープを好ましくは少なくとも2つのT細胞エピトープを含む。この発明は又、対応する天然のアレルゲン若しくはその部分と同じかそれより増大された治療特性を有するが、減少した副作用を有する改変したペプチドにも関係する。この発明は、更に、この発明のペプチドをコードする核酸配列をも提供する。個人における杉花粉に対する感受性の治療若しくは診断及び、1つ以上のこの発明のペプチドを含む治療用組成物も提供する。本発明は又、Junvi及びJunsI蛋白質アレルゲン並びにJunsI及びJunviアレルゲンをコードする核酸配列をも提供する。Junvi及びJunsIは、CryjIと免疫的に交差反応性の蛋白質アレルゲンである。



【特許請求の範囲】

1. *Cryj I* の単離されたペプチド或はその単離された部分であって、該ペプチド或はその部分は *Cryj I* の少なくとも一種の T 細胞エピトープを含み、該ペプチドは下記 : CJ 1 - 2, CJ 1 - 3, CJ 1 - 4, CJ 1 - 7, CJ 1 - 8, CJ 1 - 9, CJ 1 - 10, CJ 1 - 11, CJ 1 - 12, CJ 1 - 14, CJ 1 - 15, CJ 1 - 16, CJ 1 - 17, CJ 1 - 18, CJ 1 - 19, CJ 1 - 20, CJ 1 - 21, CJ 1 - 22, CJ 1 - 23, CJ 1 - 24, CJ 1 - 25, CJ 1 - 26, CJ 1 - 27, CJ 1 - 30, CJ 1 - 31, CJ 1 - 32 及び CJ 1 - 35 からなる群より選ぶアミノ酸配列を有する、*Cryj I* の単離されたペプチド或はその単離された部分。
2. 前記ペプチドの前記部分が図 14 に示す通りの該ペプチドの平均 T 細胞刺激インデックスに等しいか又はそれより大きい平均 T 細胞刺激インデックスを有する請求項 1 の単離されたペプチド或はその単離された部分。
3. 少なくとも二種の T 細胞エピトープを含む請求項 1 の単離されたペプチド或はその部分。
4. 杉花粉に感受性の個人に投与する際に、個人において T 細胞アネルギーを誘発し或は個人における T 細胞のリンホカイン分泌プロファイルを変える請求項 1 の単離されたペプチド或はその部分。

5. 平均 T 細胞刺激インデックス少なくとも 2.0 を有する請求項 1 の単離されたペプチドの部分。
6. *Cryj I* に感受性の個人の相当のパーセンテージにおいて、*Cryj I* に特異的な免疫グロブリン E を結合しないか、或はペプチドもしくはその部分の該免疫グロブリン E への結合が起きるならば、かかる結合は *Cryj I* に感受性の個人の相当のパーセンテージにおいてマスト細胞或は好塩基球からのメディエーターの放出を生じない請求項 1 の単離されたペプチドの全部或は部分。
7. 免疫グロブリン E を、*Cryj I* が免疫グロブリン E を結合するのに比べて相当に低い程度に結合する請求項 1 の単離されたペプチド。
8. 投与される杉花粉に感受性の個人において、個人の杉花粉へのアレルギー反

応を変える請求項1の単離されたペプチドの全部或は部分。

9. 部分がアミノ酸残基少なくとも15を含む請求項1の単離されたペプチドの部分。

10. 請求項1のペプチドの全部或は部分をコードする配列を有する単離された核酸配列、或は該核酸配列の機能的な同等物。

11. 請求項1のペプチドの全部或は部分に特異的な抗体と免疫学的に交差反応を起こし得る単離されたペプチド。

12. 請求項1のペプチドの全部或は部分と反応性のT

細胞と免疫学的に交差反応を起こし得る単離されたペプチド。

13. 杉花粉蛋白質アレルゲンCryjIの単離されたペプチド或はその部分であって、該ペプチド或はその部分は該蛋白質アレルゲンの少なくとも一種のT細胞エピトープを含み、該ペプチドは該蛋白質アレルゲンに感受性の個人群において求めてポジティビティーアインデックス少なくとも約100及び平均T細胞刺激インデックス少なくとも約3.5を有する、杉花粉蛋白質アレルゲンCryjIの単離されたペプチド或はその部分。

14. 前記個人群が少なくとも25の個人である請求項13の単離されたペプチド或はその部分。

15. 前記個人群が少なくとも30の個人である請求項14の単離されたペプチド或はその部分。

16. 前記平均T細胞刺激インデックスが少なくとも約5.0である請求項14の単離されたペプチド或はその部分。

17. 前記平均T細胞刺激インデックスが少なくとも約7.0である請求項14の単離されたペプチド或はその部分。

18. 前記ペプチドを下記：CJ1-16、CJ1-17、CJ1-20、CJ1-22、CJ1-23、CJ1-24、CJ1-26、CJ1-27、CJ1-30、CJ1-31、CJ1-32及びCJ1-35からなる群より選ぶ請求項14のペプチド或はその部分。

19. 前記ペプチドが下記：CJ1-16、CJ1-20、CJ1-22、CJ1-27及びCJ1-32からなる群より選ぶアミノ酸配列を有する請求項17のペプチド或はその部分。

20. 請求項1のペプチドの改質されたペプチド或は改質された部分。

21. CryjIに感受性の個人の相当のパーセンテージにおいて、CryjIに特異的な免疫グロブリンEを結合しないか、或はペプチドもしくはその部分の該免疫グロブリンEへの結合が起きるならば、かかる結合はCryjIに感受性の個人の相当のパーセンテージにおいてマスト細胞或は好塩基球からのメディエーターの放出を生じない請求項20の改質されたペプチド或は改質された部分。

22. 投与される杉花粉に感受性の個人において、個人の杉花粉アレルゲンへのアレルギー反応を変える請求項20の改質されたペプチド或は改質された部分。

23. 図4a～bに示す通りのCryjIのアミノ酸配列のアミノ酸151～352を含むCryjIの単離されたペプチド或はその部分。

24. 請求項23のペプチドの改質されたペプチド或は改質された部分。

25. 少なくとも2つの領域を含み、各々の領域はCryjIの少なくとも一種のT細胞エピトープを含み、該領域は各々下記：CJ1-1、CJ1-2、

CJ1-3、CJ1-4、CJ1-7、CJ1-8、CJ1-9、CJ1-10、CJ1-11、CJ1-12、CJ1-14、CJ1-15、CJ1-16、CJ1-17、CJ1-18、CJ1-19、CJ1-20、CJ1-21、CJ1-22、CJ1-23、CJ1-24、CJ1-25、CJ1-26、CJ1-27、CJ1-28、CJ1-30、CJ1-31、CJ1-32、CJ1-33、CJ1-34及びCJ1-35からなる群より選ぶアミノ酸配列の全部或は一部を含む単離されたペプチド。

26. 前記領域が下記：CJ1-2、CJ1-9、CJ1-10、CJ1-16、CJ1-17、CJ1-20、CJ1-22、CJ1-23、CJ1-24、CJ1-25、CJ1-26、CJ1-27、CJ1-30、CJ1-31、CJ1-32、CJ1-35からなる群より選ぶアミノ酸配列を含む請求項25の単離されたペプチドの全部或は部分。

27. 前記ペプチドが下記からなる群より選ぶ領域の組合せを含む請求項25の
単離されたペプチド：

C J 1 - 1 , C J 1 - 2 及び C J 1 - 3 ;

C J 1 - 1 及び C J 1 - 2 ;

C J 1 - 9 及び C J 1 - 1 0 ;

C J 1 - 1 4 , C J 1 - 1 5 , C J 1 - 1 6 及び C J 1 - 1 7 ;

C J 1 - 2 0 , C J 1 - 2 1 , C J 1 - 2 2 , C J 1

- 2 3 ;

C J 1 - 2 0 , C J 1 - 2 2 及び C J 1 - 2 3 ;

C J 1 - 2 2 及び C J 1 - 2 3 ;

C J 1 - 2 2 , C J 1 - 2 3 及び C J 1 - 2 4 ;

C J 1 - 2 4 及び C J 1 - 2 5 ;

C J 1 - 3 0 , C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ;

C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ;

C J 1 - 2 2 , C J 1 - 2 3 , C J 1 - 1 6 及び C J 1 - 1 7 ;

C J 1 - 2 2 , C J 1 - 2 3 , C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ;

C J 1 - 1 6 及び C J 1 - 1 7 ;

C J 1 - 1 6 , C J 1 - 1 7 , C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ;

C J 1 - 9 , C J 1 - 1 0 及び C J 1 - 1 6 ;

C J 1 - 1 7 , C J 1 - 2 2 及び C J 1 - 2 3 ;

C J 1 - 1 6 , C J 1 - 1 7 及び C J 1 - 2 0 ;

C J 1 - 3 1 , C J 1 - 3 2 及び C J 1 - 2 0 ;

C J 1 - 2 2 , C J 1 - 2 3 , C J 1 - 1 , C J 1 - 2 及び C J 1 - 3 ;

C J 1 - 1 6 , C J 1 - 1 7 , C J 1 - 2 2 及び C J 1 - 2 3 , C J 1 - 3 1

及び C J 1 - 3 2 ;

C J 1 - 9 , C J 1 - 1 0 , C J 1 - 1 6 , C J 1 - 1 7 , C J 1 - 2 2 及び

C J 1 - 2 3 ;

C J 1 - 9 , C J 1 - 1 0 , C J 1 - 1 6 , C J 1 -

1 7 、 C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ；

C J 1 - 9 、 C J 1 - 1 0 、 C J 1 - 2 2 、 C J 1 - 2 3 、 C J 1 - 3 1 及び
C J 1 - 3 2 ；

C J 1 - 9 、 C J 1 - 1 0 、 C J 1 - 1 6 、 C J 1 - 1 7 、 C J 1 - 2 2 、 C
J 1 - 2 3 、 C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ；

C J 1 - 1 、 C J 1 - 2 、 C J 1 - 1 6 、 C J 1 - 1 7 、 C J 1 - 2 2 及び C
J 1 - 2 3 。

2 8 . 請求項 1 の前記単離されたペプチドの或はその部分をコードする配列を有する単離された核酸或は該核酸配列の機能的な同等物。

2 9 . 請求項 2 8 の核酸によりトランスフォームされた宿主細胞において產生された単離されたペプチド。

3 0 . 請求項 2 5 のペプチドをコードする配列を有する単離された核酸或は該核酸配列の機能的な同等物。

3 1 . 請求項 3 0 の核酸によりトランスフォームされた宿主細胞において產生された単離されたペプチド。

3 2 . C r y j I の単離されたペプチドの全部或は部分であって、該ペプチド或はその部分は該蛋白質アレルゲンの少なくとも一種の T 細胞エピトープを含み、該ペプチドは X_n - Y - Z_m 式 (式中、 Y は下記 : C J 1 - 2 、 C J 1 - 3 、 C J
1 - 4 、 C J 1 - 7 、 C J 1 - 8 、 C J 1 - 9 、 C J 1 - 1 0 、 C J 1 - 1 1 、
C J 1 - 1 2 、 C J 1 - 1 4 、 C J 1 - 1 5 、 C J 1 - 1 6 、 C J 1 - 1 7 、 C
J 1 - 1 8 、 C J 1 - 1 9 、 C J 1 -

2 0 、 C J 1 - 2 1 、 C J 1 - 2 2 、 C J 1 - 2 3 、 C J 1 - 2 4 、 C J 1 - 2
5 、 C J 1 - 2 6 、 C J 1 - 2 7 、 C J 1 - 2 8 、 C J 1 - 3 0 、 C J 1 - 3 1
、 C J 1 - 3 2 及び C J 1 - 3 5 からなる群より選ぶアミノ酸配列であり、 X_n
は該蛋白質アレルゲンのアミノ酸配列における Y のアミノ末端に隣接するアミノ
酸残基であり、 Z_m は該蛋白質アレルゲンのアミノ酸配列における Y のカルボキ
シ末端に隣接するアミノ酸残基であり、 n は 0 ~ 3 0 であり、 m は 0 ~ 3 0 であ
る) を有する C r y j I の単離されたペプチドの全部或は部分。

3 3 . 部分がアミノ酸残基少なくとも 1 5 を含む請求項 3 2 の単離されたペプチドの部分。

3 4 . 蛋白質アレルゲンに感受性の個人の相当のパーセンテージにおいて、C r y j I に特異的な免疫グロブリン E を結合しないか、或はペプチド或はその部分の該免疫グロブリン E への結合が起きるならば、かかる結合は蛋白質アレルゲンに感受性の個人の相当のパーセンテージにおいてマスト細胞或は好塩基球からのメディエーターの放出を生じない請求項 3 2 の単離されたペプチドの全部或は部分。

3 5 . 免疫グロブリン E を、C r y j I が該免疫グロブリン E を結合するのに比べて相当に低い程度に結合する請求項 3 2 の単離されたペプチド或はその部分。

3 6 . C r y j I の単離されたペプチド或はその単離された部分であって、該ペプチド或はその部分は C r y j

I の少なくとも一種の T 細胞エピトープを含み、該ペプチドは図 4 a ~ b に示す通りの C r y j I のアミノ酸 2 0 ~ 3 2 4 或は 3 4 1 ~ 3 5 3 を含むアミノ酸配列を有する、C r y j I の単離されたペプチド或はその単離された部分。

3 7 . 請求項 1 の少なくとも一種の単離されたペプチド或はその部分及び製薬上許容し得るキャリヤー或は希釈剤を含む治療組成物。

3 8 . 請求項 1 3 の少なくとも一種の単離されたペプチド或はその部分及び製薬上許容し得るキャリヤー或は希釈剤を含む治療組成物。

3 9 . 請求項 2 3 の単離されたペプチド或はその部分及び製薬上許容し得るキャリヤー或は希釈剤を含む治療組成物。

4 0 . 個人における杉花粉アレルゲン或は杉花粉アレルゲンと免疫学的に交差反応を起こし得るアレルゲンへの感受性を治療するための薬剤を製造するための請求項 3 7 の組成物の使用。

4 1 . 個人における杉花粉アレルゲン或は杉花粉アレルゲンと免疫学的に交差反応を起こし得るアレルゲンへの感受性を治療するための薬剤を製造するための請求項 3 9 の組成物の使用。

4 2 . 個人における杉花粉アレルゲン或は杉花粉アレルゲンと免疫学的に交差反

応を起こし得るアレルゲンへの感受性を治療するための薬剤を製造するための請求項

37 の少なくとも二種の異なる組成物の使用。

43. 杉花粉アレルゲン或は個人において杉花粉アレルゲンと免疫学的に交差反応を起こし得るアレルゲンへの感受性を治療するための薬剤を製造するための請求項 38 の少なくとも二種の異なる組成物の使用。

44. 個人から得られる血液試料と請求項 1 の少なくとも一種のペプチドとを、血液成分とペプチドとを結合させるための適した条件下で組み合わせ、かつかかる結合が個人における杉花粉への感受性を示すものとして起きる程度を求めることを含む、個人における杉花粉への感受性を検出する方法。

45. 結合が起きる程度を、T細胞機能、T細胞増殖或はこれらの組合せを評価することによって求める請求項 44 の方法。

46. 個人から得られる血液試料と請求項 13 の少なくとも一種のペプチドとを、血液成分とペプチドとを結合させるための適した条件下で組み合わせ、かつかかる結合が個人における杉花粉への感受性を示すものとして起きる程度を求めることを含む、個人における杉花粉への感受性を検出する方法。

47. 結合が起きる程度を、T細胞機能、T細胞増殖或はこれらの組合せを評価することによって求める請求項 46 の方法。

48. 個人から得られる血液試料と請求項 32 の少なくとも一種のペプチドの全部或は部分とを、血液成分とペ

プチド或はその部分とを結合させるための適した条件下で組み合わせ、かつかかる結合が個人における杉花粉への感受性を示すものとして起きる程度を求めることを含む、個人における杉花粉への感受性を検出する方法。

49. 結合が起きる程度を、T細胞機能、T細胞増殖或はこれらの組合せを評価することによって求める請求項 48 の方法。

50. 製薬上許容し得るキャリヤー或は希釗剤及び少なくとも二種のペプチドを含み、該ペプチドは各々 C r y j I の少なくとも一種の T細胞エピトープを含む

治療組成物。

51. 前記ペプチドを下記：CJ1-1、CJ1-2、CJ1-3、CJ1-4
 、CJ1-7、CJ1-8、CJ1-9、CJ1-10、CJ1-11、CJ1-
 -12、CJ1-14、CJ1-16、CJ1-17、CJ1-18、CJ1-
 19、CJ1-20、CJ1-21、CJ1-22、CJ1-23、CJ1-
 24、CJ1-25、CJ1-26、CJ1-27、CJ1-28、CJ1-30
 、CJ1-31、CJ1-32、CJ1-33、CJ1-34及びCJ1-35
 からなる群より選び、前記組成物が前記蛋白質アレルゲンのT細胞エピトープを
 、組成物を杉花粉アレルゲンに感受性の個人に投与する際に、個人のT細胞が該
 少なくとも一種の蛋白質アレルゲンに対して寛容にされるように十分なパーセン
 テージで含む請求項50の組成物。

52. 下記からなる群より選ぶペプチド域の組合せを含む請求項51の組成物：

CJ1-1、CJ1-2及びCJ1-3；

CJ1-1及びCJ1-2；

CJ1-9及びCJ1-10；

CJ1-14、CJ1-15、CJ1-16及びCJ1-17；

CJ1-20、CJ1-21、CJ1-22、CJ1-23；

CJ1-20、CJ1-22及びCJ1-23；

CJ1-22及びCJ1-23；

CJ1-22、CJ1-23及びCJ1-24；

CJ1-24及びCJ1-25；

CJ1-30、CJ1-31及びCJ1-32；

CJ1-31及びCJ1-32；

CJ1-22、CJ1-23、CJ1-16及びCJ1-17；

CJ1-22、CJ1-23、CJ1-31及びCJ1-32；

CJ1-16、CJ1-17、CJ1-31及びCJ1-32；

CJ1-9、CJ1-10及びCJ1-16；

CJ1-16及びCJ1-17；

C J 1 - 1 7、C J 1 - 2 2 及び C J 1 - 2 3 ;

C J 1 - 1 6、C J 1 - 1 7 及び C J 1 - 2 0 ;

C J 1 - 3 1、C J 1 - 3 2 及び C J 1 - 2 0 ;

C J 1 - 2 2、C J 1 - 2 3、C J 1 - 1、C J 1 - 2 及び C J 1 - 3 ;

C J 1 - 1 6、C J 1 - 1 7、C J 1 - 2 2 及び C J 1 - 2 3、C J 1 - 3 1

及び C J 1 - 3 2 ;

C J 1 - 9、C J 1 - 1 0、C J 1 - 1 6、C J 1 - 1 7、C J 1 - 2 2 及び
C J 1 - 2 3 ;

C J 1 - 9、C J 1 - 1 0、C J 1 - 1 6、C J 1 - 1 7、C J 1 - 3 1 及び
C J 1 - 3 2 ;

C J 1 - 9、C J 1 - 1 0、C J 1 - 2 2、C J 1 - 2 3、C J 1 - 3 1 及び
C J 1 - 3 2 ;

C J 1 - 9、C J 1 - 1 0、C J 1 - 1 6、C J 1 - 1 7、C J 1 - 2 2、C
J 1 - 2 3、C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ;

C J 1 - 1、C J 1 - 2、C J 1 - 1 6、C J 1 - 1 7、C J 1 - 2 2 及び C
J 1 - 2 3

C J 1 - 1、C J 1 - 2、C J 1 - 1 6、C J 1 - 1 7、C J 1 - 2 2 及び C
J 1 - 2 3 ;

C J 1 - 2 2、C J 1 - 2 3、C J 1 - 2 4、C J 1 - 9、及び C J 1 - 1 0
;

C J 1 - 2 2、C J 1 - 2 3、C J 1 - 2 4、C J 1 - 9、C J 1 - 1 0、C
J 1 - 1 6、及び C J 1 - 1 7 ;

C J 1 - 2 2、C J 1 - 2 3、C J 1 - 2 4、C J 1 - 1 6、C J 1 - 1 7、
C J 1 - 3 1 及び C J 1 -

3 2 ;

C J 1 - 2 2、C J 1 - 2 3、C J 1 - 2 4、C J 1 - 1 6、及び C J 1 - 1
7 ;

C J 1 - 2 2 、 C J 1 - 2 3 、 C J 1 - 2 4 、 C J 1 - 9 、 C J 1 - 1 0 、 C
J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ; 並びに

C J 1 - 2 2 、 C J 1 - 2 3 、 C J 1 - 2 4 、 C J 1 - 3 1 、 及び C J 1 - 3
2 。

5 3 . 個人における杉花粉アレルゲン或は杉花粉アレルゲンと免疫学的に交差反応を起こし得るアレルゲンへの感受性を治療するための薬剤を製造するための請求項 5 0 の組成物の使用。

5 4 . 個人における杉花粉アレルゲン或は杉花粉アレルゲンと免疫学的に交差反応を起こし得るアレルゲンへの感受性を治療するための薬剤を製造するための請求項 5 2 の組成物の使用。

5 5 . C r y j I の少なくとも一種のペプチド及び製薬上許容し得るキャリヤー或は希釈剤を含む治療組成物であって、C r y j I の T 細胞エピトープを、組成物を杉花粉アレルゲンに感受性の個人に投与する際に、個人の T 細胞が C r y j I に対して寛容にされるように十分なパーセンテージで含む治療組成物。

5 6 . 請求項 5 5 の組成物を個人に治療上有効な量で投与することを含む、杉花粉アレルゲン或は個人において杉花粉アレルゲンと免疫学的に交差反応を起こし得るア

レルゲンへの感受性を治療する方法。

5 7 . C r y j I の少なくとも 1 つの断片をコードする核酸配列或は該核酸配列の機能的な同等物。

5 8 . 前記核酸配列が本質的に図 4 a ~ b に示す通りの C r y j I の核酸配列のコード部分の少なくとも 1 つの断片からなる請求項 5 7 の核酸配列。

5 9 . 請求項 5 7 の核酸配列によってコードされたペプチドを発現するためにトランスフォームされた宿主細胞。

6 0 . 請求項 5 7 の核酸配列によりトランスフォームされた宿主細胞において産生される杉花粉の少なくとも 1 つの抗原性断片。

6 1 . 前記断片が杉花粉に特異的な免疫グロブリン E を結合しないか、或は断片の該免疫グロブリン E への結合が起きるならば、かかる結合はマスト細胞或は好

塩基球からのヒスタミンの放出を生じない請求項60の少なくとも1つの抗原性断片。

62. 前記単離された抗原性断片が、投与される杉花粉に感受性の個人において、杉花粉へのアレルギー反応を変えることができる請求項60の単離された抗原性断片。

63. a) C_ry_jIの少なくとも1つの断片をコードする核酸配列によりトランスマーフォームされた宿主細胞を適した培地において培養して細胞とC_ry_jIの少なくとも1つの単離された断片を含有する培地との混合物を

生成し；及び

b) 該混合物を精製してC_ry_jIの少なくとも1つの実質的に純な断片を生成する工程を含むC_ry_jIの少なくとも1つの単離された断片を生成する方法。

64. C_ry_jIの単離されたペプチド或はその単離された部分であって、該ペプチド或はその部分はC_ry_jIの少なくとも一種のT細胞エピトープを含み、該ペプチドは下記：CJ1-1、CJ1-2、CJ1-3、CJ1-4、CJ1-7、CJ1-8、CJ1-9、CJ1-10、CJ1-11、CJ1-12、CJ1-14、CJ1-15、CJ1-16、CJ1-17、CJ1-18、CJ1-19、CJ1-20、CJ1-21、CJ1-22、CJ1-23、CJ1-24、CJ1-25、CJ1-26、CJ1-27、CJ1-28、CJ1-30、CJ1-31、CJ1-32、CJ1-33、CJ1-34及びCJ1-35からなる群より選ぶアミノ酸配列を有する、C_ry_jIの単離されたペプチド或はその単離された部分。

65. 前記ペプチドが下記：CJ1-2、CJ1-9、CJ1-10、CJ1-16、CJ1-17、CJ1-20、CJ1-22、CJ1-23、CJ1-24、CJ1-25、CJ1-26、CJ1-27、CJ1-30、CJ1-31、CJ1-32及びCJ1-35からなる群より選ぶアミノ酸配列を有する請求項64の单

離されたペプチド或はその部分。

6 6 . 杉花粉に感受性の個人に投与する際に、個人の杉花粉アレルゲンへのアレルギー反応を低減させる杉花粉アレルゲンの少なくとも 1 つの改質された断片。

6 7 . C r y j I に或はその断片に免疫学的に関係する単離された蛋白質アレルゲン或はその抗原性断片。

6 8 . C r y j I の少なくとも 1 つの単離された抗原性断片及び製薬上許容し得るキャリヤー或は希釈剤を含む治療組成物。

6 9 . 杉花粉アレルゲン C r y j I の一部をコードする核酸配列によりトランスフォームされた宿主細胞において合成される、杉花粉アレルゲン C r y j I の少なくとも 1 つの断片を含む蛋白質製剤。

7 0 . 請求項 6 9 の前記製剤を哺乳動物に治療上有効な量で投与することを含む、杉花粉アレルゲン或は該アレルゲンに感受性の哺乳動物において杉花粉アレルゲンと免疫学的に交差反応を起こし得るアレルゲンへの感受性を治療する方法。

7 1 . 哺乳動物から得られる血液試料と請求項 5 7 の核酸配列によりトランスフォームされた宿主細胞において産生される或は化学的に合成される杉花粉の精製されたされた抗原性断片とを、血液成分と断片とを結合させるための適した条件下で組み合わせ、かつかかる結合が起きる程度を求めることが含まれ、哺乳動物における杉花粉アレルゲンへの感受性を検出する方法。

7 2 . 請求項 5 7 の核酸配列によりトランスフォームされた宿主細胞において産生される或は化学的に合成される杉花粉アレルゲン C r y j I の少なくとも 1 つの抗原性断片を十分な量で哺乳動物に投与して該哺乳動物においてアレルギー反応を引き起こし、かつ個人における杉花粉アレルゲンの該抗原性断片へのアレルギー反応の発生を求めることが含まれ哺乳動物の杉花粉アレルゲンへの感受性を検出する方法。

7 3 . 杉花粉アレルゲン C r y j I の少なくとも 1 つの抗原性断片と特異的に反応性のモノクロナール抗体。

7 4 . C r y j I の単離されたペプチドの全部或は部分であって、該ペプチド或はその部分は C r y j I の少なくとも一種の T 細胞エピトープを含み、該ペプチ

ドは図4 a～bに示す通りのCryjIのアミノ酸残基1～40、アミノ酸残基81～110、アミノ酸残基151～180、アミノ酸残基191～260及びアミノ酸残基291～330からなる群より選ぶアミノ酸配列を有する、CryjIの単離されたペプチドの全部或は部分。

75. 杉花粉に感受性の個人に充分な量で投与する際に、個人の杉花粉へのアレルギー性暴露を改質することになるCryjIの抗原性断片をデザインする方法であって、

(a) CryjIのペプチドを組み換えにより或は合成により生成し；

(b) 該ペプチドを杉花粉に感受性の個人においてB細胞及び／又はT細胞反応に影響を与える能力について調べ；及び

(c) 細胞によって認識されるエピトープを含有する適したペプチドを選定する工程を含む方法。

76. CryjIの単離されたペプチド或はその単離された部分であって、該ペプチド或はその部分はCryjIの少なくとも一種のT細胞エピトープを含み、該ペプチドは下記：CJ1-41、CJ1-41.1、CJ1-41.2、CJ1-41.3、CJ1-42、CJ1-42.1、CJ1-42.2、CJ1-43、CJ1-43.1、CJ1-43.6、CJ1-43.7、CJ1-43.8、CJ1-43.9、CJ1-43.10、CJ1-43.11、CJ1-43.12、CJ1-45、CJ1-45.1、CJ1-45.2、CJ1-44、CJ1-44.1、CJ1-44.2及びCJ1-44.3からなる群より選ぶアミノ酸配列を有する、CryjIの単離されたペプチド或はその単離された部分。

77. 請求項76の少なくとも一種の単離されたペプチド或はその部分及び製薬上許容し得るキャリヤー或は希釈剤を含む治療組成物。

78. 個人における杉花粉アレルゲン或は杉花粉アレルゲンと免疫学的に交差反応を起こし得る任意のアレルゲ

ンへの感受性を治療するための薬剤を製造するための請求項76の組成物の使用

79. 杉花粉アレルゲンと免疫学的に交差反応を起こし得る前記アレルゲンが Jungs I 或は Junv I である請求項 78 の使用。

80. 請求項 76 のペプチドの改質されたペプチド或は改質された部分。

81. 個人から得られる血液試料と請求項 76 の少なくとも一種のペプチドの全部或は部分と、血液成分とペプチド或はその部分とを結合させるための適した条件下で組み合わせ、かつかかる結合が個人における杉花粉への感受性を示すものとして起きる程度を求めることを含む、個人における杉花粉への感受性を検出する方法。

82. 前記ペプチドを下記： CJ 1 - 4 1, CJ 1 - 4 1. 1, CJ 1 - 4 1. 2, CJ 1 - 4 1. 3, CJ 1 - 4 2, CJ 1 - 4 2. 1, CJ 1 - 4 2. 2, CJ 1 - 4 3, CJ 1 - 4 3. 1, CJ 1 - 4 3. 6, CJ 1 - 4 3. 7, CJ 1 - 4 3. 8, CJ 1 - 4 3. 9, CJ 1 - 4 3. 10, CJ 1 - 4 3. 11, CJ 1 - 4 3. 12, CJ 1 - 4 5, CJ 1 - 4 5. 1, CJ 1 - 4 5. 2, CJ 1 - 4 4, CJ 1 - 4 4. 1, CJ 1 - 4 4. 2 及び CJ 1 - 4 4. 3 からなる群より選び、前記組成物が前記蛋白質アレルゲンの T 細胞エピトープを、組成物を杉花粉アレルゲンに感受性の個人に投与する際に、個人の T 細胞が該少なくとも

一種の蛋白質アレルゲンに対して寛容にされるように十分なパーセンテージで含む請求項 76 の組成物。

83. 個人における杉花粉アレルゲン或は杉花粉アレルゲンと免疫学的に交差反応を起こし得る任意のアレルゲンへの感受性を治療するための薬剤を製造するための請求項 76 の組成物の使用。

84. 杉花粉アレルゲンと免疫学的に交差反応を起こし得る前記アレルゲンが Jungs I 或は Junv I である請求項 83 の使用。

85. Junv I の単離され、精製された天然蛋白質或はペプチド。

86. Jungs I をコードするヌクレオチド配列を有する単離された核酸或はその少なくとも一種の断片或は該ヌクレオチド配列の機能的同等物。

87. 前記ヌクレオチド配列が本質的に図16のヌクレオチド配列のコード部分からなる請求項86の単離された核酸配列。

88. 前記ヌクレオチド配列が本質的に図16のヌクレオチド配列からなる請求項86の単離された核酸配列。

89. Jungs Iをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクター或はその少なくとも一種の断片或は該ヌクレオチド配列の機能的同等物。

90. 前記ヌクレオチド配列が本質的に図16のヌクレオチド配列のコード部分からなる請求項89の発現ベクター。

91. 請求項86の核酸によってコードされた蛋白質或はペプチドを発現するためにトランスフォームされた宿主細胞。

92. 請求項86の核酸によってトランスフォームされた宿主細胞において産生される、単離されたJungs I蛋白質或はその少なくとも一種の抗原性断片。

93. Junv Iをコードするヌクレオチド配列を有する単離された核酸或はその少なくとも一種の断片或は該ヌクレオチド配列の機能的同等物。

94. 前記ヌクレオチド配列が本質的に図17のヌクレオチド配列のコード部分からなる請求項93の単離された核酸配列。

95. 前記ヌクレオチド配列が本質的に図17のヌクレオチド配列からなる請求項93の単離された核酸配列。

96. Junv Iをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクター或はその少なくとも一種の断片或は該ヌクレオチド配列の機能的同等物。

97. 前記ヌクレオチド配列が本質的に図17のヌクレオチド配列のコード部分からなる請求項96の発現ベクター。

98. 請求項93の核酸によってコードされた蛋白質或はペプチドを発現するためにトランスフォームされた宿主細胞。

99. 請求項93の核酸によってトランスフォームされた宿主細胞において産生される、単離されたJunv I

蛋白質或はその少なくとも一種の抗原性断片。

100. a) Jun s I 或はその断片をコードする核酸配列によりトランスフォームされた宿主細胞を適した培地において培養して細胞と該 Jun s I 或はその少なくとも一種の断片を含有する培地との混合物を生成し；及び

b) 該混合物を精製して実質的に純な Jun s I 或はその少なくとも一種の断片を生成する

工程を含む Jun s I 或はその少なくとも一種の断片を生成する方法。

101. 単離された Jun s I 或はその少なくとも一種の抗原性断片。

102. 単離された Jun s I 花粉アレルゲン或はその少なくとも一種の断片及び製薬上許容し得るキャリヤー或は希釀剤を含む治療組成物。

103. Jun s I の全部或は一部をコードする核酸配列によりトランスフォームされた宿主細胞において合成された Jun s I 或はその少なくとも一種の断片を含む蛋白質製剤。

104. 花粉に感受性の哺乳動物における Juniperus 種からの花粉アレルゲンへの感受性を治療するための薬剤を製造するために請求項 103 の製剤を使用する方法。

105. 哺乳動物から得られる血液試料と請求項 86 の核酸配列によりトランスフォームされた宿主細胞におい

て産生される或は化学的に合成される精製された Jun s I アレルゲン或はその抗原性断片とを組み合わせて該哺乳動物においてアレルギー性反応を引き起こし、かつ個人における該 Jun s I アレルゲン或はその抗原性断片へのアレルギー性反応の発生を求めるなどを含む、哺乳動物における Jun s I への感受性を検出する方法。

106. Jun s I 或はその少なくとも 1 つの抗原性断片と特異的に反応性のモノクローナル抗体。

107. 前記アレルゲン或はその断片が Juniperus 種からの花粉に特異的な免疫グロブリン E を結合しないか、或は Jun s I アレルゲン或はその断片の該免疫グロブリン E への結合が起きるならば、かかる結合はマスト細胞或は好塩基球からのヒスタミンの放出を生じない請求項 92 の単離された Jun s I 或

はその少なくとも1つの抗原性断片。

108. 前記単離されたアレルゲン或は前記抗原性断片が、投与される Juniperus 種からの花粉に感受性の個人において、Juniperus 種からの花粉へのアレルギー反応を変えることができる請求項107の単離されたアレルゲン或は抗原性断片。

109. a) JunvI 或はその断片をコードする核酸配列によりトランスフォームされた宿主細胞を適した培地において培養して細胞と JunvI 或はその少なくとも1つの断片を含有する培地との混合物を生成し；及び

b) 該混合物を精製して実質的に純な JunvI 或はその少なくとも1つの断片を生成する

工程を含む JunvI 或はその少なくとも1つの断片を生成する方法。

111. 単離された JunvI 或はその少なくとも1つの抗原性断片。

112. 単離された JunvI 花粉アレルゲン或はその少なくとも1つの断片及び製薬上許容し得るキャリヤー或は希釈剤を含む治療組成物。

113. JunvI の全部或は一部をコードする核酸配列によりトランスフォームされた宿主細胞において合成された JunvI 或はその少なくとも1つの断片を含む蛋白質製剤。

114. 花粉に感受性の哺乳動物における Juniperus 種からの花粉アレルゲンへの感受性を治療するための薬剤を製造するために請求項113の製剤を使用する方法。

115. 哺乳動物から得られる血液試料と請求項93の核酸配列によりトランスフォームされた宿主細胞において產生される或は化学的に合成される精製された JunvI アレルゲン或はその抗原性断片とを組み合わせて該哺乳動物においてアレルギー性反応を引き起こし、かつ個人における該 JunvI アレルゲン或はその抗原性断片へのアレルギー性反応の発生を求めるこ

とを含む、哺乳動物における JunvI への感受性を検出する方法。

116. JunvI 或はその少なくとも1つの抗原性断片と特異的に反応性のモ

ノクローナル抗体。

117. 前記アレルゲン或はその断片が Juniperus 種からの花粉に特異的な免疫グロブリンEを結合しないか、或は JunvI アレルゲン或はその抗原性断片の該免疫グロブリンEへの結合が起きるならば、かかる結合はマスト細胞或は好塩基球からのヒスタミンの放出を生じない請求項 99 の単離された JunvI 或はその少なくとも 1 つの抗原性断片。

118. 前記単離されたアレルゲン或は前記抗原性断片が、投与される Juniperus 種からの花粉に感受性の個人において、Juniperus 種からの花粉へのアレルギー反応を変えることができる請求項 117 の単離されたアレルゲン或は抗原性断片。

119. 杉花粉蛋白質アレルゲン CryjI の特有の抗原性断片或はその部分。

120. CryjI の少なくとも一種のT細胞エピトープを含み、前記蛋白質アレルゲンに感受性の個人群において求めて平均 T 細胞刺激インデックス少なくとも約 3.0 を有する請求項 119 の特有の抗原性断片或はその部分。

121. 前記個人群が少なくとも 25 である請求項 120 の特有の抗原性断片。

122. 前記平均 T 細胞刺激インデックスが少なくとも約 5.0 である請求項 120 の特有の抗原性断片。

【発明の詳細な説明】

杉花粉由来のアレルゲン性蛋白質及びペプチド

発明の背景

遺伝的素因を有する個人（人口の約10%に及ぶ）は、彼らがさらされる種々の環境起源の抗原に対して過剰感作（アレルギー性）となる。それらの即時型及び／又は遅延型の過敏症を誘発し得る抗原はアレルゲンとして知られている（King, T.P., *Adv. Immunol.* 23: 77-105, (1976)）。枯草熱、喘息及び発疹の症状を含むアナフィラキシー又はアトピーは、即時型アレルギーの一形態である。それは、草、木、雑草、動物の鱗屑、昆虫、食物、薬物及び化学物質等の種々のアトピー性アレルゲンによって引き起こされ得る。

アトピー性アレルギーに関する抗体は、主として免疫グロブリンIgEクラスに属する。IgEはマスト細胞及び好塩基球と結合する。特定のアレルゲンと、マスト細胞又は好塩基球に結合したIgEとの結合により、IgEは、その細胞上で架橋されてIgE-抗原相互作用の生理的效果を生じ得る。これらの生理的效果は、他の物質のうちで、ヒスタミン、セロトニン、ヘパリン、エオシン好性白血球及び／又はロイコトリエンに対する走化性因子、C4、D4及びE4の放出を含み、これらは、気管支平滑筋細胞の長期の収縮を引き起こす

(Hood, L.E. 等、*Immunology* (第2版), The Benjamin/Cumming Publishing Co., Inc. (1984))。これらの放出された物質は、IgEと特異的アレルゲンとの結合により引き起こされるアレルギー性症状を生じるメディエーターである。それらを介してアレルゲンの効果は現れる。かかる効果は、その性質が、抗原が体内に侵入した経路及びIgEのマスト細胞又は好塩基球への付着パターンによって、全身性であり又は局所的である。局所的出現は、一般に、アレルゲンが体内に侵入した場所の上皮表面に起きる。全身性効果は、アナフィラキシー（アナフィラキシー性ショック）を含み、それは、循環（血管内）抗原に対するIgE-好塩基球の応答の結果である。

杉（スギ：*Cryptomeria japonica*）花粉症は、日本における最も重大なアレルギー性疾患の一つである。この病気を患っている患者数は増加中であり、幾つか

の地域では人口の10%より多くが影響を受けている。杉花粉抽出物を投与してアレルゲンに対して除感作することによる杉花粉症の治療が試みられてきた。しかしながら、杉花粉抽出物を用いる除感作は、高投与量で用いるならばそれがアナフィラキシーを誘出し得るという欠点を有しており、他方、低投与量を用いてアナフィラキシーを回避した場合には治療はその抽出物に対する寛容を確立するために数年間継続しなければならない。

杉花粉に由来する主要なアレルゲンは精製され、スギ

塩基性蛋白質（S B P）又はCryjIと呼ばれている。この蛋白質は、分子量41～50kDaでpI 8.8の塩基性蛋白質であることが報告されている。部分的に異なるグリコシレーションのために、このアレルゲンの多くのイソ型があるらしい（Yasueda等（1983）J.AllergyClin.Immunol.71：77-86；及びTaniai等（1988）FEBSLetters239：329-332）。CryjIのN末端の最初の20アミノ酸の配列及び16アミノ酸の内部配列が決定された（Taniai、前出）。

分子量約37kDaを有しCryjIIとして知られる杉花粉の第2のアレルゲンも又報告された（Sakaguchi等、（1990）Allergy45：309-312）。このアレルゲンは、CryjIとの免疫交差反応性を有しないことが見出された。杉花粉症の殆どの患者は、CryjI及びCryjIIの両者に対するIgE抗体を有することが見出されたが、幾人かの患者からの血清はCryjI又はCryjIIのみと反応した。

低投与量の杉花粉抽出物を用いる杉花粉症患者の除感作に加えて、1990年7月3日にMatsuhashi等に発行された米国特許第4,939,239号は、杉花粉に過敏性の人の除感作用の杉花粉アレルゲンに共有結合した糖類を含む除感作剤を開示している。この除感作剤は、IgG及びIgM抗体の産生を促進するがアレルゲンに特異的であってアナフィラキシー及びアレルギーの原因であるIgE抗体の産生を減じることが報告されている。これらの除感作剤において用いられるアレルゲン

は、好ましくは、NH₂末端アミノ酸配列Asp-Asn-Pro-Ile-Ala-Ser-X-Trp-Ala-Gly-Ala-Ser-Ser-Ala-Trp

- A l a - G l n - A s n - A r g - M e t - L y s - , (ここに X は S e r , C y s , T h r 又は H i s である) (配列番号 : 18) を有する。更に、Usui等 (1990) Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 91 : 74-79 は、アルツス反応を誘出するスギ塩基性蛋白質 (即ち、CryjI) - プルラン結合体の能力が天然のスギ塩基性蛋白質のそれより約 1000 倍低く顕著に減じたことを報告し、且つスギ塩基性蛋白質 - プルラン結合体が杉花粉症に対する脱感作治療のための優れた候補であることを示唆した。

*Cryptomeria japonica*中に見出される CryjIアレルゲンは又、*Cupressus sempervirens*を含む他の種の木からの花粉中のアレルゲンと交差反応性であることも見出されている。Panzani等 (Annals of Allergy 57 : 26-30 (1986)) は、皮膚試験 (RAST及びRAST阻害) において *Cupressus sempervirens*と *Cryptomeria japonica*の花粉のアレルゲンの間で交差反応性が検出されたことを報告した。柏 (Mountain Cedar) (*Juniperus sabinaoides*のこと。*Juniperus ashei*としても知られる) から単離された 50 kDa のアレルゲンは、NH₂末端配列 Asp Asn Pro Ile Asp (配列番号 : 25) を有し (Gross等 (1978) Scand. J. Immunol. 8 : 437-441) 、それは CryjIアレルゲンの NH₂末端の最初の 5 アミノ

酸と同じ配列である。CryjIアレルゲンは又、アレルゲン的に、次の種の木々と交差反応性であることも見出された。*Cupressus arizonica*, *Cupressus macrocarpa*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis*, *Thuya orientalis*及び *Chamaecyparis obtusa*。

杉花粉症アレルゲンに注意が払われたにもかかわらず、人々に悪影響を及ぼす原因であるアレルゲンの特定又は特性決定は非常に不完全である。現在の脱感作治療は、もし高投与量の花粉抽出物を投与するならば付隨するアナフィラキシーの危険を伴う花粉抽出物を用いる治療、又は低投与量の花粉抽出物を投与する場合に長期の脱感作時間を要する治療を含んでいる。

発明の要約

本発明は、*Cryptomeria japonica*主要花粉アレルゲン CryjIをコードする核酸配列及びその断片を提供する。本発明は又、CryjIをコードする核酸配列又は少

なくともその1断片でトランスフォームされた宿主細胞内で產生された単離されたCryjI又は少なくともその1断片及び合成により調製したCryjIの断片を提供する。

本発明は又、CryjIと免疫的に交差反応性のJunvI及びJunsI蛋白質アレルゲン並びにJunvI及びJunsIの断片（JunsI又はJunvIをそれぞれコードする核酸配列でトランスフォームした宿主細胞内で產生されたもの）並びに合成により調製したJunsI及びJunvIの断片をも提

供する。本発明は、更に、JunvI及びJunsIをコードする核酸配列並びにそれらの断片を提供する。ここで用いる場合、CryjI、JunsI又はJunvIの完全アミノ酸配列をコードする核酸配列の断片とは、CryjI、JunsI又はJunvI及び／又は成熟CryjI、JunsI又はJunvIの完全アミノ酸配列をコードする核酸配列よりも少ない塩基を有する核酸配列のことをいう。CryjI、JunsI又はJunvI及びこれらの断片は、杉花粉症並びに杉花粉アレルゲンと免疫的に交差反応性である他の種の木々からの花粉により引き起こされる花粉症を診断し、治療し及び予防するために有用である。

この発明の範囲内のペプチドは、好ましくは、CryjIの少なくとも1つのT細胞エピトープを、一層好ましくは少なくとも2つのT細胞エピトープを含む。この発明は、更に、少なくとも2つの領域（各領域は、杉花粉蛋白質アレルゲンの少なくとも1つのT細胞エピトープを含む）を含むペプチドを提供する。この発明は又、対応する天然のアレルゲン又はその部分と同じ又は増大された治療特性を有するが減少した副作用を有する改変されたペプチド、並びに増大された溶解度及び安定性等の改善された特性を有する改変されたペプチドをも提供する。この発明のペプチドは、それらを投与した杉花粉に過敏性の個人又は杉花粉と交差反応性のアレルゲンに過敏性の個人において、杉花粉アレルゲン又は杉花粉と交差反応性のアレルゲン（例えば、JunsI又はJunvI）に

対するその個人のアレルギー応答を調節することが出来る。個人における杉花粉又は交差反応性アレルゲンに対する感受性の治療又は診断方法及びこの発明の1

つ以上のペプチドを含む治療用組成物も又提供する。この発明を、請求の範囲に一層詳細に記載し且つその好適具体例を以下の説明に記載する。

図面の簡単な説明

図1aは、10 mM酢酸ナトリウム(pH 5.0)及び0.15 MNaClで平衡化したSuperdex75(60 cmにつき2.6)上でアフィニティ精製したCryjIのグラフ表示である。

図1bは、図1aに示した主要ピークからの画分のSDS-PAGE(12.5%)分析を示す。

図2は、SDS-PAGEで分離し、mAB CBF2をプローブとした精製した天然のCryjI蛋白質のイソ型のウエスタンプロットを示す。

図3は、15人のアレルギー患者のプールからの血漿を用いた、精製した天然CryjIの種々の精製画分のアレルギー性血清滴定のグラフ表示である。

図4a～bは、CryjIをコードする2つの重複するクローンJC71.6及びpUC19JC91aからの複合核酸配列を示す。CryjIに対する完全なcDNA配列は1312ヌクレオチドからなり、5' 非翻訳配列の66ヌクレオチド、1122ヌクレオチドの開始メチオニンに対するコ

ドンで始まるオープンリーディングフレーム及び3' 非翻訳領域を含む。図4a～bは又、CryjIの演繹されたアミノ酸アミノ酸配列をも示している。

図5aは、被覆抗原が杉花粉からの可溶性花粉抽出物(SPE)であるIgE結合反応の結果のグラフ表示である。

図5bは、被覆抗原が精製した天然CryjIであるIgE結合反応の結果のグラフ表示である。

図6は、被覆抗原が杉花粉からの可溶性花粉抽出物(SPE)である、15人の患者からのプールしたヒト血漿(PHP)を用いた競争ELISAの結果のグラフ表示である。

図7は、被覆抗原が杉花粉からの可溶性花粉抽出物(SPE)であり競争抗原が精製した天然CryjIである、個々の患者からの血漿(患者番号で示す)を用いた競争ELISAの結果のグラフ表示である。

図8aは、被覆抗原が杉花粉からの可溶性花粉抽出物(SPE)である、7人の個々の患者からの血漿(患者番号で示す)を用いた直接結合ELISAの結果のグラフ表示である。

図8bは、被覆抗原が還元剤DTTの存在下で煮沸させることにより変性させた変性した可溶性花粉抽出物である、7人の個々の患者からの血漿(患者番号で示す)を用いた直接結合ELISAの結果のグラフ表示である。

図9は、ウェルを組換えCryjI(rCryjI)で被覆し且つIgE結合を個々の患者にてアッセイした、直接ELISAのグラフ表示である。

図10aは、ウェルをCBF2(IgG)mAbで被覆し、PBSを陰性抗原対照として用い且つ抗原が精製した組換えCryjIであった、15人の患者からのプールしたヒト血漿を用いる捕獲ELISAの結果のグラフ表示である。

図10bは、ウェルを $20\mu g/ml$ CBF2(IgG)で被覆し、PBSを陰性抗原対照として用い且つ抗原が精製した組換えCryjIであった、ウサギ抗AmbaI及びIIを用いる捕獲ELISAの結果のグラフ表示である。

図11は、杉花粉からのSPE、精製した天然CryjI及び組換えCryjIを追加抗原として用いて杉花粉アレルギー患者について行なったヒスタミン放出アッセイのグラフ表示である。

図12は、抗原が組換えCryjI蛋白質、精製した天然CryjI蛋白質又は選択したCryjIペプチド、組換えAmba1.1である、999番の患者からの血液を用いるT細胞増殖アッセイの結果のグラフ表示である。

図13は、CryjIから誘導された所望の長さの種々のペプチドを示す。

図14は、精製した天然CryjIでイン・ビトロで誘発し且つ種々のCryjIペプチドに対する応答につき応答の

パーセントにより分析した、25人の患者からのT細胞系統の応答(陽性)を、少なくとも2のS.I(各棒の上に示す)、このペプチドに対する陽性応答の平均刺激インデックス(各棒の上に括弧内に示す)及びポジティビティーアンデックス(Y軸)で描写するグラフ表示である。

図15は、あるCryjI蛋白質、精製した天然CryjI及びrCryjIに対するIgEの直接結合アッセイの結果のグラフ表示である。

図16は、JunsIのヌクレオチド配列を示す。この配列は2つの重複するcDNAクローンpUC19JS42e及びpUC19JS45a並びにJunsIをコードする完全長クローンJS53iibからの複合物である。JunsIに対する完全なcDNAは1170ヌクレオチドからなり、5'非翻訳配列の25ヌクレオチド、1,101ヌクレオチドのオープンリーディングフレーム及び3'非翻訳領域を含む。図16は又、JunsIの演繹されたアミノ酸配列をも示す。

図17は、JunvIのヌクレオチド配列を示す。この配列はJunvIをコードする2つの重複するcDNAクローンpUC19JV46a及びpUC19JV49iiaからの複合物である。JunvIに対する完全なcDNA配列は1278ヌクレオチドからなり、5'非翻訳配列の35ヌクレオチド、1,101ヌクレオチドのオープンリーディングフレーム及び3'非翻訳領域を含む。図17は又、演繹された

JunvIのアミノ酸配列をも示している。

図18は、CryjIから導かれた所望の長さの種々のペプチドを示している。

図19a及び19bは、CryjI又はCryjI相同物をコードし得るmRNAの同定のためのCryjcDNAをプローブとした花粉誘導されたRNAのノーザンプロットを示す。図19aは、CryjI cDNAをプローブとして、C.japonica（米国及び日本国産）、J.sabinoides及びJ.virginianaからのRNAを示す。図19bは、同じcDNAをプローブとして、J.sabinoides及びC.arizonicaからのRNAを示している。分子量標準の位置を図の各部に示す。

発明の詳細な説明

本発明は、CryjI（杉花粉に見出される主要アレルゲン）をコードする核酸配列並びにJunvI及びJunsIをコードする核酸配列を提供する。CryjIをコードする核酸配列は、好ましくは、図4a及び4bに示す配列（配列番号：1）を有する。図4a及び4bに示すCryjIをコードする核酸配列（配列番号：1）は、塩基66から128までの21アミノ酸リーダー配列を含む。このリーダー配列は、塩基129から1187によりコードされる成熟蛋白質から開裂される。CryjI

の演繹されたアミノ酸配列も又図4 a 及び 4 b に示してある（配列番号：2）。この発明の核酸配列は、予想される分子量38。

5 kDa、pI 7.8 及び潜在的なN結合グリコシレーション部位を有する蛋白質をコードする。これらのグリコシレーション部位の利用は、分子量を増加させ、成熟蛋白質のpIに影響する。この発明の核酸配列によりコードされる成熟蛋白質に対する演繹されたアミノ酸配列は、Taniai等（前出）により報告された公知のNH₂末端及び内部のアミノ酸配列と同じである。Taniai等（前出）により報告されたCryjIのNH₂末端は配列番号：18に示した配列を有する。Taniai等（前出）により報告された内部配列は、配列GluAlaPheAsnValGluAsnGlyAsnAlaThrProGlnLeuThrLys（配列番号：19）を有する。この発明の核酸配列には配列多形が認められる。例えば、配列番号1のアミノ酸38、51及び74をコードするコドンにおける1つの独立のヌクレオチドの置換（それぞれ、GGA対GAA、G TG対GCG、及びGGG対GAG）は、これらの部位におけるアミノ酸多形（それぞれ、G対E、V対A及びG対E）を生じ得る。更に、單一ヌクレオチド置換が、日本において採集されたCryptomeria japonica花粉から導かれた一つのcDNAクローンにおいて検出された。この配列番号1のアミノ酸60に対するコドンにおける置換（TAT対CAT）は、この部位におけるアミノ酸多形（Y対H）を生じ得る。更なるサイレントヌクレオチド置換が検出された。更なる配列多形が存在することが予想され、且つ

CryjIをコードする核酸配列中の1つ以上のヌクレオチド（ヌクレオチドの1%まで）が、自然の対立遺伝子変化のために個々のCryptomeria japonica間で変化し得ることは当業者によって評価されよう。任意の及びすべてのかかるヌクレオチド変化及びその結果のアミノ酸多形は、この発明の範囲内にある。更に、1つ以上のCryjIのファミリーメンバーが存在し得る。かかるファミリーメンバーは、機能及びアミノ酸配列においてCryjIと関連するが別個の遺伝子座によってコードされる蛋白質として定義される。

CryjI又は交差反応性アレルゲンの断片をコードする核酸配列の断片も又、この発明の範囲内にある。この発明の範囲内の断片は、CryjI又は交差反応性アレルゲン例えばJunvI若しくはJunsIの部分をコードするものを含み、これらは、哺乳動物好ましくはヒトにおいて免疫応答を誘発する（最小量のIgEの刺激； IgEの結合； IgG及びIgM抗体の產生の誘出； 又は増殖及び／又はリンホカイン分泌及び／又はT細胞アネルギーの誘導等のT細胞応答の誘出等）。前述のCryjIの断片を、ここでは、抗原性断片という。この発明の範囲内の断片は、CryjIと交差反応性のアレルゲンを検出するスクリーニングプロトコールにおいて用いるために、他の植物種からの核酸とハイブリダイズし得るものをも含む。ここで用いる場合、CryjIをコードする核酸配列の断片とは、CryjI及び／又は成熟CryjIの完全アミノ酸配列を

コードする核酸配列より少ない塩基を有する核酸配列をいう。一般に、CryjIの断片をコードする核酸配列を、成熟蛋白質をコードする塩基から選択するが、ある場合には、この発明の核酸配列のリーダー配列部分からの断片の全部又は一部を選択することが望ましい。この発明の核酸配列は又、CryjI又はその断片のクローニング、発現又は精製に有用なリンカー配列、改変された制限エンドヌクレアーゼ部位及びその他の配列をも含む。

CryjIをコードする核酸配列は、*Cryptomeria japonica*植物から得ることが出来る。しかしながら、出願人は、CryjIをコードするmRNAは市販の*Cryptomeria japonica*花粉からは得られないことを見出した。この花粉からmRNAを得ることが出来ないのは市販の花粉の貯蔵又は輸送の問題のためであろう。出願人は、新鮮な花粉及び雄蕊を有する球果がCryjI mRNAの良い源であることを見出した。*Cryptomeria japonica*は杉の周知の種であり、植物材料は野生、耕作又は装飾用植物から得ることが出来る。CryjIをコードする核酸配列は、ここに開示する方法又は遺伝子の単離及びクローニングのための他の任意の適当な方法を用いて得ることが出来る。この発明の核酸配列はDNA又はRNAであつてよい。

本発明は、この発明の核酸配列を発現するための発現ベクター及びransf

オームした宿主細胞を提供する。CryjI、JunvI又はJunsIをコードする核酸配列又

はそれらの少なくとも1断片をE. coli等の細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルス）、酵母、又はチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）等の哺乳動物細胞中で発現させることが出来る。適当な発現ベクター、プロモーター、エンハンサー及び他の発現制御要素は、Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ColdSpring Harbor, ニューヨーク（1989）中に見出すことが出来る。他の適当な発現ベクター、プロモーター、エンハンサー及び他の発現要素は、当業者には公知である。哺乳動物、酵母又は昆虫細胞内での発現は、組換え物質の部分的な又は完全なグリコシレーション及び鎖間又は鎖内ジスルフィド結合の形成へと導く。酵母内での発現のための適当なベクターは、YepSec1 (Baldari等 (1987) Embo J. 6: 229-234) ; pMFa (Kurjan及びHerskowitz (1982) Cell 30: 933-943) ; JRY88 (Schultz等 (1987) Gene 54: 113-123) 及びpYES2 (Invitrogen Corporationカリフォルニア、San Diego在) を含む。これらのベクターは自由に入手することが出来る。バキュロウイルス及び哺乳動物発現系も又入手可能である。例えば、バキュロウイルス系は、昆虫細胞中での発現用に市販されており（カリフォルニア、San Diego在、PharMingen）、他方、pMSGベクターは、哺乳動物細胞内での発現用に市販されている（ニュージャージー、Piscataway在、Pharmacia）。

E. coli内での発現のためには、適当な発現ベクター

は、他のもの内で、pTRC (Amann等 (1988) Gene 69: 301-315) ; pGEX (オーストラリア、Melbourne在、Amrad Corp.) ; pMAL (マサチューセッツ、Beverly在、N.E.Biolabs) ; pRIT5 (ニュージャージー、Piscataway在、Pharmacia) ; pET-11d (ウィスコンシン、Madison在、Novagen) Jameel等、(1990) J.Virol. 64: 3963-3966；及びpSEM (Knapp等 (1990) BioTechniques 8: 280-281) を含む。例えば、pTRC及びpET-11dの利用は、未融合蛋白質の発現へと導く。pMAL、pRIT5、pSEM及びpGEXの利用は、マルトースE結合蛋白質 (pMAL) 、蛋白質A (pRIT5)

、切り詰めた β -ガラクトシダーゼ (PSEM) 又はグルタチオン S-トランスフェラーゼ (pGEX) に融合したアレルゲンの発現へと導くであろう。CryjI断片又はその断片が融合蛋白質として発現される場合には、キャリアー白質と CryjI 又はその断片との間の融合点に酵素開裂部位を導入することは特に有利である。次いで、CryjI 又はその断片を融合蛋白質からその酵素部位における酵素開裂並びに蛋白質及びペプチド精製のための従来技術を用いる生化学的精製によって回収することが出来る。適当な酵素開裂部位は、血液凝固因子 Xa 又はトロンビンに対するものを含み、それに対する適当な酵素は、例えば、ミズーリ、St. Louis 在、Sigma Chemical Company 及びマサチューセッツ、Beverly 在、N.E.Biolabs から入手することが出来る。種々のベクターは、構成的発現又は例えば IPTG 誘導 (PRTCAmann 等、(1988) 前出; pET-11d, ウィスコンシン、

Madison 在、Novagen) 若しくは温度誘導 (pRIT5、ニュージャージー、Piscataway 在、Pharmacia) を用いる誘導可能な発現を可能にする種々のプロモーター領域を有する。組換えにより発現される蛋白質を分解する能力を変えた種々の E. coli 宿主中で組換え CryjI を発現させることも適当であろう (例えば、米国特許第 4,758,512 号)。或は、E. coli により優先的に利用されるコドンを用いるように核酸配列を変えることは有利であり得る (ここに、かかる核酸の変化は、発現されるアミノ酸配列に影響を与えないものである)。

宿主細胞は、リン酸カルシウム若しくは塩化カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、又は電気穿孔法等の従来技術を用いて、この発明の核酸配列を発現するようにトランスフォームすることが出来る。宿主細胞をトランスフォームするための適当な方法は、Sambrook 等、前出及び他の実験室用テキスト中に見出され得る。

この発明の核酸配列は又、標準的技術を用いて合成することも出来る。

本発明は又、単離した杉花粉アレルゲン CryjI 又は少なくともその 1 断片を製造する方法をも提供し、それは、杉花粉アレルゲン CryjI 又は少なくともその 1 断片をコードする核酸配列でトランスフォームした宿主細胞を適当な培地中で培養して該杉花粉アレルゲン CryjI 若しくはその少なくとも 1 断片を含む細胞及び

培地の混合

物を生成し；そしてその混合物を精製して実質的に純粋な杉花粉アレルゲンCryjI又はその少なくとも1断片を生成する工程を含んでいる。CryjI又はその少なくとも1断片をコードするDNAを含む発現ベクターでトランスフォームした宿主細胞をその宿主細胞に適した培地中で培養する。CryjI蛋白質及びペプチドは、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動及びCryjI若しくはその断片に特異的な抗体を用いる免疫精製を含むペプチド又は蛋白質を精製するための公知技術を用いて、細胞培養培地、宿主細胞又はその両者から精製することが出来る。単離した及び精製したという用語は、ここでは、交換可能であって、組換えDNA技術により生成したときに、実質的に細胞性物質若しくは培養培地を含まず、又は、化学合成する場合には、化学的前駆体若しくは他の化学物質を実質的に含まないペプチド、蛋白質、蛋白質断片及び核酸配列のことをいう。

この発明の他の面は、杉花粉アレルゲンCryjI又はJunvI若しくはJunsI等の交差反応性アレルゲン又はこれらの少なくとも1断片（杉花粉アレルゲンCryjI又はかかる交差反応性アレルゲンをコードする核酸配列でトランスフォームした宿主細胞内で合成されたもの、或は化学合成したもの）、及び単離した杉花粉アレルゲンCryjI蛋白質又はJunvI若しくはJunsI等の交差反応性アレルゲン又はこれらの少なくとも1つの抗原性断片

（この発明の核酸配列でトランスフォームした宿主細胞内で生成したもの、或は化学合成したもの）を含む調製物を提供する。この発明の好適具体例において、CryjI蛋白質は、少なくとも成熟CryjI蛋白質をコードする核酸配列でトランスフォームした宿主細胞内で產生される。

ここで定義する抗原性断片は、免疫応答を誘発する任意の蛋白質断片又はペプチドをいう。ここで定義するユニークな抗原性断片とは、CryjIから誘導される任意の抗原性断片のことをいうが、図4a～4bに示すアミノ酸1～20又は325～340からなる断片は除く。杉花粉からのアレルゲン又はJunvI若しくはJ

unsI等の交差反応性アレルゲンの抗原性断片は、例えば、かかるペプチドをコードするこの発明の核酸配列の対応する断片から組換えにより生成された又は公知技術を用いて化学合成したペプチドをスクリーニングすることによって得ることが出来る。このアレルゲンを、ペプチドの重複を有しない所望の長さの断片に自由に分割することが出来るが、好ましくは、所望の長さの重複した断片に分割することが出来る。これらの断片を試験してそれらの抗原性（例えば、断片の免疫応答を誘発する能力）を測定する。もしCryjIの断片を治療目的に用いるならば、刺激等のT細胞応答（即ち、増殖又はリンホカイン分泌）を誘出することが出来及び／又はT細胞アネルギーを誘導することが出来るCryjIアレルゲンの断片は特に望まし

く、又、最小IgE刺激活性を有する杉花粉の断片も又望ましい。最小IgE刺激活性とは、天然のCryjI蛋白質により刺激されたIgE産生の量より少ないIgE刺激活性のことをいう。更に、治療目的のためには、T細胞応答を誘出することが出来、杉花粉に特異的なIgEと結合しないか又は精製した天然の杉花粉アレルゲンがかかるIgEと結合するより実質的に低い程度でかかるIgEと結合する単離した杉花粉アレルゲン例えばCryjI若しくはその断片を用いることは好ましい。もし単離した杉花粉アレルゲン又はその断片がIgEと結合するならば、かかる結合がマスト細胞又は好塩基球からのメディエーター（例えば、ヒスタミン）の放出を生じないことが望ましい。更に、もしJunvI若しくはJunsIを治療目的に用いるならば、T細胞応答を誘出することが出来、Juniperus種からの花粉に特異的なIgEと結合しないか又は精製した天然のJuniperus花粉アレルゲンがかかるIgEと結合するより実質的に低い程度でかかるIgEと結合するJuniperusの花粉アレルゲン例えばJunvI若しくはJunsI又はそれらの断片を用いるのが望ましい。もし単離したJunvI若しくはJunsI又はそれらの断片がIgEと結合するならば、かかる結合がマスト細胞又は好塩基球からのメディエーター（例えば、ヒスタミン）の放出を生じないことが好ましい。

杉花粉から単離した蛋白質アレルゲン又はその好適な抗原性断片は、杉花粉感受性の個人又はJuniperus virg

iniana若しくはJuniperus sabinaoides（前述）等の杉花粉アレルゲンと交差反応性のアレルゲンに対してアレルギーの個人に投与したときに、その個人の杉花粉若しくはかかる交差反応性アレルゲンに対するアレルギー応答を調節することが出来、好ましくは、その個人のそのアレルゲンに対するB細胞応答、T細胞応答又はB細胞及びT細胞の両方の応答を調節することが出来る。ここで用いる場合、杉花粉アレルゲン又は交差反応性アレルゲンに感受性の個人のアレルギー応答の調節は、標準臨床手順により測定したときに、アレルゲンに対する非応答性又は症状の減少として定義することが出来る（例えば、Varney等、British Medical Journal, 302: 265-269 (1990)を参照されたい）（杉花粉誘発性の喘息症状の減少を含む）。ここでいう場合、症状の減少は、個人がこの発明のペプチド若しくは蛋白質を用いる治療管理を完了した後でのアレルゲンに対する任意のアレルギー応答の減少を含む。この減少は、主観的なものであって良い（即ち、患者がアレルゲンの存在下で一層快適に感じればよい）。症状の減少は又、公知の標準皮膚試験を用いて臨床的に測定することも出来る。

単離したCryjI蛋白質又はその断片を、好ましくは、Tamura等(1986)Microbiol. Immunol. 30: 883-896又は米国特許第4, 939, 239号に開示されたマウスマodel等の杉花粉の哺乳動物モデルにて、又はChiba等(1990)Int. Arch. Allergy Immunol. 93: 83-88に開示された靈長

類モデルにて試験する。蛋白質又はその断片に対するIgE結合についての初期スクリーニングは、実験動物又はヒトのボランティアに対するスクラッチ試験又は皮内皮膚試験によって、又はRAST（放射アレルゲン吸着試験）、RAST阻害、ELISAアッセイ、放射免疫アッセイ（RIA）又はヒスタミン放出（実施例7及び8参照）にて行なうことが出来る。

T細胞刺激活性を有し、従って、少なくとも1つのT細胞エピトープを含む本発明の抗原性断片は、特に望ましい。T細胞エピトープは、アレルギーの臨床症状の原因となる蛋白質アレルゲンに対する免疫応答の開始及び持続に関与すると考えられている。これらのT細胞エピトープは、抗原提示細胞の表面上の適当な

H L A 分子に結合して関連 T 細胞サブポピュレーションを刺激することによりヘルパー T 細胞のレベルで初期事象の引き金を引くと考えられる。これらの事象は、T 細胞増殖、リンホカイン分泌、局所的炎症反応、追加の免疫細胞のその部位への補充及び抗体産生へ導く B 細胞カスケードの活性化へと導く。これらの抗体の 1 つのイソ型である I g E は、アレルギー症状の発達に基本的に重要であり、その產生は事象のカスケードの初期に、ヘルパー T 細胞のレベルで、分泌されたリンホカインの性質により影響を受ける。T 細胞エピトープは、T 細胞レセプターによる認識の基本要素又は最小単位であり、このエピトープはレセプター認識に必須のアミノ酸を含んでいる。T 細胞

エピトープのアミノ酸配列を真似るアミノ酸配列及び蛋白質アレルゲンに対するアレルギー応答を調節するアミノ酸配列は、この発明の範囲内にある。

杉花粉患者を、本発明の単離した蛋白質アレルゲン又は本発明の抗原性断片（少なくとも 1 つの T 細胞エピトープを含み、蛋白質アレルゲンから誘導される）にさらすと、適当な T 細胞サブポピュレーションを寛容化し又は免疫性減少させて、それらを蛋白質アレルゲンに対して非応答性にし且つこのようにさらされても免疫応答の刺激に関与しないようにすることができます。更に、少なくとも 1 つの T 細胞エピトープを含むこの発明の蛋白質アレルゲン又は本発明の抗原性断片の投与は、天然の蛋白質アレルゲン又はその部分にさらすことと比較してリンホカイン分泌プロファイルを調節することが出来る（例えば、IL-4 の減少及び／又は IL-2 の増加を生じる）。更に、かかる蛋白質アレルゲン又はかかる蛋白質アレルゲンの抗原性断片にさらすことは、通常そのアレルゲンに対する応答に関与する T 細胞サブポピュレーションに影響を与えて、それらの T 細胞が通常そのアレルゲンにさらされる部位（例えば、鼻粘膜、皮膚及び肺）から離れて治療用の断片又は蛋白質アレルゲンの投与部位に向かうようにすることができます。この T 細胞サブポピュレーションの再分配は、アレルゲンに通常さらされる部位において通常の免疫応答を刺激する患者の免疫系の能力を改善し又は減少させ、アレルギー症状の減少を

生じる。

単離したCryjI、JunvI又はJunsI蛋白質及びそれらから導かれる断片又は部分(ペプチド)を、杉花粉アレルゲン又は交差反応性蛋白質アレルゲンに対するアレルギー反応を診断し、治療し及び予防する方法において用いることが出来る。従って、本発明は、単離した杉花粉アレルゲンCryjI、JunvI若しくはJunsI又はそれらの少なくとも1断片(CryjI、JunvI若しくはJunsI又はそれらの少なくとも1断片を発現するようにトランスフォームした宿主細胞にて生成したもの)及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釗剤を含む治療用組成物を提供する。この発明の治療用組成物は又、合成により調製したCryjI、JunvI若しくはJunsI又はそれらの少なくとも1断片及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釗剤を含んでもよい。脱感作されるべき個人への本発明の治療用組成物の投与は、公知技術を用いて行なうことが出来る。CryjI、JunvI若しくはJunsI蛋白質又はそれらの少なくとも1断片を例えば適当な希釗剤、キャリアー及び/又はアジュバントと組合せて個人に投与することが出来る。製薬上許容し得る希釗剤は塩溶液及び緩衝剤水溶液を含む。製薬上許容し得るキャリアーは、ポリエチレングリコール(Wie等(1981)Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 64: 84-99)及びリポソーム(Strejan等(1984)J. Neuroimmunol. 7: 27)を含む。T細胞アネルギーを誘導する目的には、この治療用組成物

を、好ましくは、非免疫原形態(例えば、アジュバントを含まない)で投与する。この発明の治療用組成物を、杉花粉感受性の個人又は杉花粉アレルゲン(即ち、*Juniperus virginiana*又は*Juniperus sabinaoides*等)と免疫的に交差反応性のアレルゲンに感受性の個人に投与する。

脱感作されるべき個人への本発明の治療用組成物の投与は、その個人のアレルゲンに対する感受性を減じる(即ち、アレルギー応答を減じる)のに十分な投与量及び期間で、公知の手順を用いて行なうことが出来る。この治療用組成物の有効量は、その患者の杉花粉に対する感受性の程度、年齢、性別及び体重、並びにこの蛋白質又はその断片がその個人における抗原応答を誘出する能力等の因子によって変化する。

この活性化合物（即ち、蛋白質又はその断片）を、注射（皮下、静脈注射等）、経口投与、吸入、経皮的投与等の便利な方法で投与することが出来る。投与の経路によって、この活性化合物を、この化合物を不活性化し得る酵素、酸及び他の自然条件から保護するための物質で被覆することが出来る。

例えば、1投与量単位当り、好ましくは約 $1\text{ }\mu\text{g} \sim 3\text{ mg}$ の、一層好ましくは約 $20 \sim 500\text{ }\mu\text{g}$ の活性化合物（即ち、蛋白質又はその断片）を注射により投与することが出来る。投与量管理は、最適な治療応答を与えるように調節することが出来る。例えば、幾つかの分割し

た投与量を日々投与することが出来、或は投与量を治療状況の緊急性の指示に応じて減らすことが出来る。

蛋白質又はペプチドを非経口投与以外の投与法により投与するためには、この蛋白質をその不活性化を阻止する物質で被覆する（又はその物質と同時投与する）ことが必要であろう。例えば、蛋白質又はその断片をアジュバント中にて投与し、又は酵素阻害剤と共に又はリポソーム内にて同時投与することが出来る。酵素阻害剤は、胰臓トリプシン阻害剤、ジイソプロピルフルオロホスフェート（D E P）及びトラシロールを含む。リポソームは、水中油中水 C G F エマルジョン並びに従来のリポソーム（Strejan等、(1984)J. Neuroimmunol. 7: 27）を含む。

この活性化合物は又、非経口投与或は腹膜内投与することも出来る。分散を、グリセロール、液体ポリエチリングリコール及びこれらの混合物中及び油中で調製することも出来る。通常の貯蔵及び使用の条件下において、これらの製剤は、微生物の成長を阻止する防腐剤を含むことが出来る。

注射用途に適した製薬組成物は、滅菌した水溶液（水溶性の場合）若しくは分散又は滅菌した分散の注射用溶液を即座に調製するための滅菌した粉末を含む。すべての場合に、この組成物は、無菌的でなければならず且つ容易に注射可能である程度に流動性でなければならない。それは、製造及び貯蔵条件下で安定でなければなら

ず、細菌及びカビ等の微生物の夾雜に対して保護されなければならない。キャリアーは、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコール等）、これらの適当な混合物並びに植物油を含む溶剤又は分散媒質であってよい。適当な流動性を、例えばリシチン等の被覆の利用、分散の場合の必要な粒子寸法の維持及び界面活性剤の利用によって維持することが出来る。微生物の作用の阻止は、種々の抗細菌剤及び抗真菌剤例えばパラベンス、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、サメロサル等によって達成することが出来る。多くの場合に、等張剤例えば糖、ポリアルコール（マンニトール及びソルビトール等）又は塩化ナトリウムをこの組成物中に含むことは好ましい。注射用組成物の長期の吸収は、吸収を遅らせる薬剤例えばアルミニウムモノステアレート及びゼラチンをこの組成物に含ませることで引き起こし得る。

滅菌した注射用溶液は、活性化合物（即ち、蛋白質又はペプチド）を必要な量で適當な溶媒に必要ならば上記の成分の1つ又は組合せたものと共に取り込ませてから滅菌濾過することによって調製することが出来る。一般に、分散を、活性化合物、基本分散媒質及び上記のものから選ぶ必要な他の成分を含む滅菌したビヒクルに取り込ませることにより調製することが出来る。滅菌した注射用溶液の調製用の滅菌した粉末の場合には、調製の好

適な方法は、前もって滅菌濾過した溶液からの任意の所望の追加の成分をえた活性成分（即ち、蛋白質又はペプチド）の粉末を生成する真空乾燥及び凍結乾燥である。

上記のように蛋白質又はそのペプチドが適当に保護されれば、その蛋白質は、例えば不活性な希釈剤又は同化可能な食べられるキャリアーと共に経口投与することが出来る。この蛋白質及び他の成分は、硬い又は軟らかい殻のゼラチンカプセルに封入し、錠剤に圧縮し、又は個人の食餌に直接取り込ませることも出来る。経口の治療用投与のために、この活性化合物に賦形剤を取り込ませて摂取可能な錠剤、口内錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウエハース等の形態で使用することが出来る。かかる組成物及び製剤は、少なくとも

1重量%の活性化合物を含むべきである。勿論、この組成物及び製剤のパーセンテージは、変化することが出来、約5～80重量%単位が好都合である。かかる治療上有用な組成物における活性化合物の量は、適当な薬量が得られるようなものである。本発明による好適な組成物又は製剤は、経口投与量単位が約10μg～200mgの活性化合物を含むように調製する。

錠剤、トローチ、ピル、カプセル等は、次のものをも含んでよい。ガムグラガカンス (gragacanth)、アカシア、コーンスターク又はゼラチン等の結合剤、リン酸二カルシウム等の賦形剤、コーンスターク、ジャガイモ澱

粉、アルギン酸等の分散剤、マグネシウムステアレート等の潤滑剤、ショ糖、ラクトース又はサッカリン等の甘味剤、或は、ペパーミント、冬緑油又はサクランボ薬味等の薬味剤。投与量単位形態がカプセルである場合には、それは、上記の型の物質に加えて、液体キャリアーを含むことが出来る。種々の他の物質が、被覆として或は投与量単位の物理的形態を変えるように存在し得る。例えば、錠剤、ピル又はカプセルは、セラック、糖又は両者で被覆することが出来る。シロップ又はエリキシルは、活性化合物、甘味剤としてのショ糖、防腐剤としてのメチル及びプロピルパラベンス、色素及びサクランボ若しくはオレンジ風味等の薬味を含んでよい。勿論、任意の投薬量単位形態の調製に用いる任意の物質は、製薬上純粹であり、用いる量において実質的に非毒性であるべきである。更に、この活性化合物を、持続的放出用製剤及び配合物に取り込ませることが出来る。

ここで用いる場合、「製薬上許容し得るキャリアー」は、任意の及びすべての溶媒、分散媒質、被覆、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤等を含む。製薬上活性な物質のためのかかる媒質及び薬剤の利用は、当業者には周知である。任意の従来の媒質又は薬剤が活性化合物と相容れないことがないかぎり、治療用組成物におけるその利用は企図される。補足的活性化合物をこの組成物に取り込ませることも出来る。

非経口組成物を投与量単位形態で配合することは、投与の容易さ及び均一な投与量に対して特に有利である。投与量単位は、ここで用いる場合、治療される哺

乳動物患者に対する単位投与量に適した物理的に別個の単位をいう（各単位は、所望の治療効果を生じるように計算して予め決めた量の活性化合物を必要な製薬上のキャリアーと共に含む）。この発明の新しい投与量単位形態についての規格は、（a）活性化合物の独自の性質及び達成すべき特定の治療効果、並びに（b）かかる活性化合物を個人の感受性の治療用に混合する技術における本質的限界により指図され且つこれらに直接依存する。

CryjI cDNA（又は該cDNAが転写されたmRNA）又はその一部を用いて、任意の種類又は型の植物において類似の配列を同定することが出来、従って、CryjI cDNA若しくはmRNA又はそれらの部分にハイブリダイズするだけ十分な相同性を有する配列（例えば、*Juniperus virginiana*, *Juniperus sabinaoides*等のアレルゲンからのDNA）を低緊縮条件下で同定し又は「引き出す」ことが出来る。それらの十分な相同性（一般に40%を超える）を有する配列を、ここに記載した方法を用いて、更なる評価のために選択することが出来る。或は、高緊縮条件を用いることが出来る。この方法では、本発明のDNAを用いて、他の型の植物、好ましくは関連する科、属又は種（例えば、*Juniperus*又は*Cupressus*）において、杉花粉アレルゲンCryjIのアミ

ノ酸配列に類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする配列を同定することが出来、それ故、他の種におけるアレルゲンを同定することが出来る。従って、本発明は、CryjIを含むだけでなく、本発明のDNAとハイブリダイズするDNAによりコードされる他のアレルゲンをも含む。この発明は、更に、単離したアレルゲン性蛋白質又はそれらの断片を含み、それらは、抗体交差反応（単離したアレルゲン性蛋白質又はそれらの断片はこの発明の蛋白質及びペプチドに特異的な抗体に結合することが出来る）により、又はT細胞交差反応（単離したアレルゲン性蛋白質又はそれらの断片はこの発明の蛋白質及びペプチドに特異的なT細胞を刺激することが出来る）等により、免疫的にCryjI又はその断片と関係している。

本発明のcDNAによりコードされる蛋白質又はペプチドを、例えば、「精製した」アレルゲンとして用いることが出来る。かかる精製したアレルゲンは、杉

花粉症の診断及び治療のための鍵となる試薬であるアレルゲン抽出物の標準化において有用である。更に、CryjIの核酸配列に基づくペプチドを用いることにより、抗ペプチド抗体又はモノクローナル抗体を、標準的方法を用いて作成することが出来る。例えば、マウス又はウサギ等の動物を、単離したCryjI蛋白質の免疫原（例えば、CryjI蛋白質又は抗体応答を誘出することの出来る抗原性断片）で免疫化することが出来る。蛋白質又はペプチドサ

ブユニットに免疫原性を与えるための技術は、キャリアーへの結合又は他の当業者に周知の技術を含む。CryjI蛋白質又はそのペプチドをアジュバントの存在下で投与することが出来る。免疫化の進行は、血漿又は血清中の抗体力値の検出により監視することが出来、抗体のレベルを評価するための抗原としてこの免疫原を用いて標準ELISA又は他の免疫アッセイを利用することができる。

免疫化の後に、抗CryjI抗血清を得ることが出来、所望であれば、その血清からポリクローナル抗CryjI抗体を得ることが出来る。モノクローナル抗体を生成するために、抗体産生細胞（リンパ球）を、免疫化した動物から採取し、ミエローマ細胞等の不滅化細胞を用いる標準的体細胞融合手順により融合させてハイブリドーマ細胞を生成することが出来る。ハイブリドーマ細胞を、CryjI蛋白質又はそのペプチドと反応性の抗体の産生について免疫化学的にスクリーニングすることが出来る。これらの血清又はモノクローナル抗体を用いてアレルゲン抽出物を標準化することが出来る。

本発明のペプチド及び蛋白質の利用により、首尾一貫した、十分に規定された組成及び生物学的活性を有する製剤を作成して治療目的のために投与することが出来る（例えば、杉感受性の個人のかかる木々の花粉に対するアレルギー応答を調節する等）。かかるペプチド又は蛋白質の投与は、例えば、CryjIアレルゲンに対するB細

胞応答、CryjIアレルゲンに対するT細胞応答又は両方の応答を調節することが出来る。単離したペプチドは又、Cryptomeria japonicaアレルギーの免疫療法の機構を研究し及び免疫療法において有用な改変した誘導体又はアナログをデザイ

ンするために用いることも出来る。

他の人々の仕事は、一般に、アレルゲンの高投与量が最良の結果（即ち、最大の症状軽快）を生じるということを示した。しかしながら、多くの人々は、アレルゲンに対するアレルギー反応のために、アレルゲンの大量投与に耐えられない。対応する天然のアレルゲンと同じかそれより増大された治療特性を有するが減少した副作用（特に、アナフィラキシー反応）を有する改変したペプチド又は改変したアレルゲンが生成されるような方法で、天然のアレルゲンの改変をデザインすることが出来る。これらは、例えば、本発明の蛋白質又はペプチド（例えば、CryjIのアミノ酸配列の全部又は一部を有するもの）、又は改変した蛋白質若しくはペプチド、又は蛋白質若しくはペプチドのアナログであってよい。

溶解度を増し、治療若しくは予防効果又は安定性（例えば、生体外での貯蔵寿命及びイン・ビボでの蛋白質分解に対する抵抗性）を増大させる等の目的で、この発明のペプチドの構造を改変することも可能である。免疫原性を改変し及び／又はアレルゲン性を減じるために、アミノ酸置換、欠失又は付加等によってアミノ酸配列が変化した、或は、同じ目的のために成分が加えられた、改

変したペプチドを生成することが出来る。

例えば、ペプチドを、強い増殖応答の誘導能力を伴わないでT細胞アネルギーを誘導し及びMHC蛋白質に結合する能力、並びに免疫原形態での投与時の増殖応答を維持するように改変することが出来る。この場合には、T細胞レセプターに対する重大な結合残基を、公知の技術（例えば、各残基の置換及びT細胞反応性の存否の測定）を用いて決定することが出来る。T細胞レセプターとの相互作用に必須であることが示されたそれらの残基を、必須アミノ酸を他のもの好ましくはその存在がT細胞反応性を増大し、除去はしないが減少させ、又は該反応性に影響しない類似のアミノ酸残基で置換（保存的置換）することによって改変することが出来る。更に、T細胞レセプター相互作用に必須でないアミノ酸残基を、その取り込みがT細胞反応性を増大し、減少させ、又は該反応性に影響しないが関連MHCへの結合を除去しない他のアミノ酸により置換することによって改変することが出来る。

更に、この発明のペプチドを、MHC蛋白質複合体との相互作用に必須であるべきことが示されたアミノ酸を他のもの好ましくはその存在がT細胞活性を増大し、除去はしないが減少させ又は該活性に影響しないことが示された類似のアミノ酸残基と置換（保存的置換）することによって改変することが出来る。更に、MHC蛋白質複合体との相互作用に必須でないがMHC蛋白質複合体

にやはり結合するアミノ酸残基を、その取り込みがT細胞反応性を増大し、影響せず又は除去はしないが減少させる他のアミノ酸で置換することによって改変することが出来る。非必須アミノ酸についての好適なアミノ酸置換は、アラニン、グルタミン酸又はメチルアミノ酸での置換を含む（但し、それらに限定はされない）。

安定性及び／又は反応性を増大するために、この発明の蛋白質又はペプチドを改変して、その蛋白質アレルゲンのアミノ酸配列に、自然の対立遺伝子変化から生じる1つ以上の多形を取り込むことも出来る。更に、Dアミノ酸、非天然アミノ酸又は非アミノ酸アナログを代用とし又は加えて、この発明の範囲内の改変した蛋白質又はペプチドを生成することが出来る。更に、本発明の蛋白質又はペプチドを、A. Sehonと共同研究者（Wie等、前出）のポリエチレンギリコール（PEG）法を用いて改変してPEGと結合した蛋白質又はペプチドを生成することが出来る。更に、PEGを、この発明の蛋白質又はペプチドの化学合成中に加えることが出来る。蛋白質若しくはペプチド又はその部分の改変は又、還元／アルキル化（Tarr、Methods of Protein Microcharacter-ization, J. E. Silver編、Humana Press, Clifton, NJ, 155-194頁（1986）中）；アシル化（Tarr、前出）；適当なキャリアへの化学カップリング（Mishell及びShiigi編、Selected Methods in Cellular Immunology, WH Freeman, San Francisco, CA(1980)；米国特許第4,

939, 239号）；又は温和なホルマリン処理（Marsh International Archives of Allergy and Applied Immunology, 41: 199-215(1971)）をも含むことが出来る。

この発明の蛋白質及びペプチドの精製を容易にし且つ溶解度を潜在的に増大させるために、そのペプチドの主鎖にレポーター基を加えることが出来る。例えば、ポリヒスチジンをペプチドに加えてそのペプチドを固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーで精製することが出来る (Hochuli, E. 等、Bio/Tech nology, 6: 1321-1325(1988))。更に、特異的なエンドプロテアーゼ開裂部位を、所望であれば、レポーター基とペプチドのアミノ酸配列との間に導入して無関係の配列を含まないペプチドの単離を促進することが出来る。蛋白質抗原に対して個人を上首尾に脱感作するためには、蛋白質若しくはペプチドの溶解度を、そのペプチドに官能基を付加することにより又は疎水性T細胞エピトープ若しくはこれらのペプチド中の疎水性エピトープを含む領域若しくはこの蛋白質若しくはペプチドの疎水性領域を含まないことによって、増大させることが必要であろう。

ペプチド内のT細胞エピトープの適当な抗原プロセッシングを潜在的に補助するため、それぞれ少なくとも1つのT細胞エピトープを含む領域間で、標準的プロテアーゼ感受性部位を組換えにより又は合成によって工作することが出来る。例えば、KK若しくはRR等の荷電

したアミノ酸の対を、ペプチドの組換え構築中にペプチド内の領域間に導入することが出来る。その結果のペプチドを、カテプシン及び／又は他のトリプシン様酵素開裂に対して感受性にして1つ以上のT細胞エピトープを含むペプチドの部分を生成することが出来る。更に、かかる荷電アミノ酸残基は、ペプチドの溶解度の増大を生じさせることが出来る。

この発明のペプチド若しくは蛋白質（例えば、CryjI又はその断片）をコードするDNAの位置指定突然変異導入法を利用して、公知の方法によってこのペプチド若しくは蛋白質の構造を改変することが出来る。かかる方法は、その他の方法の内で、縮退したオリゴヌクレオチド (Ho等、Gene, 77: 51-59(1989)) を用いるか又は全合成の突然変異遺伝子 (Hostomsky, Z.等、Biochem. Biophys. Res. Comm., 161: 1056-1063(1989)) を用いるPCRを含む。細菌での発現を促進するために、前述の方法を他の手順と共に用いて、この発明の蛋白質若しくはペ

ペプチドをコードするDNA構築物中の真核生物用コドンを、E. coli、酵母、哺乳動物細胞又は他の真核生物細胞中で優先的に利用されているものに変えることが出来る。

現在利用可能な構造的情報を用いて、杉花粉感受性の個人に十分量で投与したときにその個人の杉花粉に対するアレルギー応答を調節するCryjIペプチドをデザインすることが出来る。これは、例えば、CryjIの構造を調べ、杉花粉感受性の個人におけるB細胞及び／又はT細

胞応答に影響を与える能力について試験すべきペプチドを（発現系により、合成により若しくはその他の方法により）生成し及びそれらの細胞により認識されるエピトープを含む適当なペプチドを選択することによって行なうことが出来る。エピトープというときは、そのエピトープはレセプター特に免疫グロブリン、組織適合性抗原及びT細胞レセプター（このエピトープはレセプター認識に必須のアミノ酸を含む）による認識の基本要素であり又は単位である。これらのエピトープのアミノ酸配列を真似るアミノ酸配列及びCryjIに対するアレルギー応答を下方制御することの出来る配列を利用することも出来る。

杉花粉アレルゲンが杉花粉感受性の個人にアレルギー反応を誘発する能力をブロックし若しくは阻止することの出来る薬剤若しくは薬物をデザインすることも現在可能である。かかる薬剤は、例えば、それらが関連する抗CryjI IgEに結合し、それ故、IgE-アレルゲン結合及びその後のマスト細胞脱顆粒を阻止するような方法でデザインすることが出来る。或は、かかる薬剤は、免疫系の細胞成分に結合することが出来、Cryptomeria japonica花粉アレルゲンに対するアレルギー応答の抑制若しくは脱感作を生じる。これの非制限的な例は、杉花粉に対するアレルギー応答を抑制する本発明のcDNA／蛋白質構造に基づく、適当なB及びT細胞エピトープペプチド又はそれらの改変物の利用である。これは、杉

花粉感受性の個人からの血液成分を用いるイン・ビトロ研究においてB及びT細胞機能に影響を与えるB及びT細胞エピトープペプチドの構造を限定することに

より行なうことが出来る。

本発明の蛋白質、ペプチド又は抗体を、杉花粉症を検出し及び診断するために利用することも出来る。例えば、これは、杉花粉に対する感受性を評価すべき個人から得た血液若しくは血液生成物を、単離した抗原性ペプチド若しくはCryjIのペプチド、又は単離したCryjI蛋白質と、血液成分（例えば、抗体、T細胞、B細胞）とペプチド若しくは蛋白質との結合に適した条件下で合わせて、かかる結合が起きる程度を測定することによって行なうことが出来る。

本発明は又、CryjIのすべての若しくは少なくとも1つの断片をコードする核酸配列（例えば、DNA）を含む発現ベクターを含む宿主細胞をCryjI若しくは少なくともその1断片の発現に適した条件下で培養することを含むCryjI若しくはその断片を生成する方法をも提供する。次いで、発現された生成物を公知技術を用いて回収する。或は、CryjI若しくはその断片を、公知の機械的若しくは化学的技術を用いて合成することが出来る。

この発明の任意の具体例において用いたDNAは、ここに記載したようにして得られたcDNAであるか、或は、ここに表示した配列の全部若しくは一部を有する任意のオリゴデオキシヌクレオチド配列又はそれらの機能

的等価物であつてよい。かかるオリゴデオキシヌクレオチド配列は、公知技術を用いて、化学的若しくは酵素的に生成することが出来る。オリゴヌクレオチド配列の機能的等価物は、1) 配列番号1の配列（又は対応する配列部分）又はその断片がハイブリダイズする相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズし得る配列、又は2) 配列番号1に相補的な配列（又は対応する配列部分）及び／又は3) 配列番号1の配列（又は対応する配列部分）によりコードされる生成物と同じ機能的特性を有する生成物（例えば、ポリペプチド又はペプチド）をコードする配列であるものである。機能的等価物が一方の基準を満たさなければならないか両方の基準を満たさなければならぬかは、その利用に依る（例えば、もしそれがオリゴプローブとしてのみ用いられるならば、それは第1若しくは第2の基準を満たしきえすれば良く、もしそれがCryjIアレルゲンを生成するために用いられるならば、第3の基準さえ満たせば良い）。

本発明は又、杉花粉蛋白質から導かれた単離したペプチドをも提供する。ここで用いる場合、ペプチド若しくは蛋白質の断片とは、それが導かれた完全なアミノ酸配列より少ないアミノ酸残基を有するアミノ酸配列のことをいう。この発明のペプチドは、アレルゲンの少なくとも1つのT細胞エピトープを含むCryjIから導かれたペプチドを含む。

少なくとも2つの領域（各領域は、杉花粉の少なくと

も1つのT細胞エピトープを含む）を含むペプチドも又この発明の範囲内にある。単離したペプチド又は単離したペプチドの領域（それぞれ、杉花粉アレルゲンの少なくとも2つのT細胞エピトープを含む）は、増大された治療効果の故に、特に望ましい。本発明のペプチドと（例えば、抗体により又はT細胞交差反応性により）免疫的に関連するペプチドも又この発明の範囲内にある。

この発明の単離したペプチドは、かかるペプチドをコードする配列を有する核酸でトランスフォームした宿主細胞における組換えDNA技術により、上述のように生成することが出来る。この発明の単離したペプチドを化学合成によって生成することも出来る。単離したJunvI蛋白質若しくはペプチドに関して、かかる蛋白質若しくはペプチドは、公知の方法でJuniperus virginiana花粉から天然のJunvI蛋白質を生化学的に精製することによって生成することが出来る。ペプチドを組換え技術により生成するときには、そのペプチドをコードする配列を有する核酸又はその核酸配列の機能的等価物でトランスフォームした宿主細胞をその細胞に適した培地で培養し、そして、ペプチドを、細胞培養培地、宿主細胞又はその両者から、ペプチド及び蛋白質を生成するための当業者に公知の技術を用いて精製することが出来、該公知技術は、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動又は、このペプチド、そのペプチドが導かれた蛋白質アレルゲン杉花粉又

はその一部に特異的な抗体を用いる免疫精製を含む。この発明の単離したペプチドは、組換えDNA技術により生成したときに、実質的に細胞性物質又は培養培地を含まず、或は、化学合成したときに、化学的前駆体又は他の化学物質を実質

的に含まない。

本発明の単離したペプチドを得るために、CryjIを実施例6で論じるように、重複しない所望の長さのペプチド又は重複する所望の長さのペプチドに分割する（組換えにより又は合成によって生成することが出来る）。少なくとも1つのT細胞エピトープを含むペプチドは、T細胞増殖又はリンホカイン分泌等のT細胞応答を誘出することが出来及び／又はT細胞アネルギー（即ち、寛容）を誘導することが出来る。少なくとも1つのT細胞エピトープを含むペプチドを測定するために、単離したペプチドを、例えば、T細胞生物学技術によって試験してこれらのペプチドがT細胞応答を誘出し又はT細胞アネルギーを誘導するか否かを測定する。T細胞応答を誘出し又はT細胞アネルギーを誘導することが見出されたそれらのペプチドをT細胞刺激活性を有すると規定する。

実施例6で論じるように、ヒトT細胞刺激活性は、杉花粉アレルゲンに感受性の個人（即ち、杉花粉アレルゲンに対するIgE媒介の免疫応答を有する個人）から得られたT細胞を培養し、そして例えばトリチウム化チミジンの細胞への取り込みにより測定したときにそのペプ

チドに応答してT細胞の増殖が起きるか否かを測定することによって試験することが出来る。ペプチドに対するT細胞の応答についての刺激インデックスは、ペプチドに対する応答における最大CPMを対照のCPMで除したものとして計算することが出来る。バックグラウンドレベルの2倍以上の刺激インデックス（S.I.）を「陽性」とみなす。陽性結果を用いて、試験した患者群についての各ペプチドに対する平均刺激インデックスを計算する。この発明の好適なペプチドは、少なくとも1つのT細胞エピトープを含み且つ2.0以上の平均T細胞刺激インデックスを有する。2.0以上の平均T細胞刺激インデックスを有するペプチドは、治療剤として有用であると考えられる。好適ペプチドは、少なくとも2.5の、もっと好ましくは少なくとも3.5の、一層好ましくは少なくとも4.0の、更に好ましくは少なくとも5の、更に一層好ましくは少なくとも7の、最も好ましくは少なくとも約9の平均T細胞刺激インデックスを有する。例えば、図14に示した少なくとも5の平均T細胞刺激インデックスを有するこの発明の

ペプチドは、C J 1 - 2 、 C J 1 - 7 、 C J 1 - 1 0 、 C J 1 - 1 7 、 C J 1 - 2 0 、 C J 1 - 2 2 、 C J 1 - 2 3 、 C J 1 - 2 4 、 C J 1 - 2 7 、 C J 1 - 3 1 、 C J 1 - 3 2 及び C J 1 - 3 5 を含む。例えば、図 1 4 に示した少なくとも 7 の平均 T 細胞刺激インデックスを有するこの発明のペプチドは、C J 1 - 1 6 、 C J 1 - 2 0 、

C J 1 - 2 2 及び C J 1 - 3 2 を含む。

更に、好適ペプチドは、少なくとも約 1 0 0 の、一層好ましくは少なくとも約 2 5 0 の、最も好ましくは少なくとも約 3 5 0 のポジティビティーアイデックス (P. I.) を有する。あるペプチドのポジティビティーアイデックスは、平均 T 細胞刺激インデックスに、杉花粉に感受性の個人の集団（例えば、好ましくは少なくとも 1 5 人、一層好ましくは少なくとも 3 0 人以上）内における少なくとも 2. 0 のかかるペプチドに対する T 細胞刺激インデックスを有する個人のパーセントを乗じることによって決定される。従って、ポジティビティーアイデックスは、あるペプチドに対する T 細胞応答の強度 (S. I.) と杉花粉に感受性の個人の集団におけるあるペプチドに対する T 細胞応答の頻度の両方を表す。例えば、図 1 4 に示すように、ペプチド C J 1 - 2 2 は、試験した個人の群において、1 4 . 5 の平均 S. I. 及び 6 0 % の陽性応答を有し、その結果、ポジティビティーアイデックス及び少なくとも約 4 の平均 T 細胞刺激インデックスを有する Cr yjI のペプチドは、C J 1 - 1 6 、 C J 1 - 1 7 、 C J 1 - 2 0 、 C J 1 - 2 2 、 C J 1 - 2 3 、 C J 1 - 2 4 、 C J 1 - 2 6 、 C J 1 - 2 7 、 C J 1 - 3 2 及び C J 1 - 3 5 を含む。

正確な T 細胞エピトープを、例えば、精密マッピング

技術によって決定するためには、T 細胞生物学技術により測定したときに T 細胞刺激活性を有し従って少なくとも 1 つの T 細胞エピトープを含むペプチドを、そのペプチドのアミノ若しくはカルボキシ末端の何れかのアミノ酸残基の付加若しくは欠失によって改変し、その改変したペプチドに対する T 細胞反応性の変化を

測定する。もし天然の蛋白質配列内の重複領域を共有する2つ以上のペプチドが、T細胞生物学技術により測定したときに、ヒトT細胞刺激活性を有することが見出されるならば、かかるペプチドの全部若しくは一部を含む更なるペプチドを生成することが出来、それらの更なるペプチドを同様の手順により試験することが出来る。この技術の後に、ペプチドを、組換え若しくは合成によって選択し及び生成する。ペプチドを、そのペプチドに対するT細胞応答の強度（例えば、刺激インデックス）、杉花粉に感受性の個人の集団におけるそのペプチドに対するT細胞応答の頻度及びそのペプチドの前記の他の種の木々（例えば、*Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus sabina*等）又はブタクサ (*Amba I. 1*) からの他のアレルゲンとの潜在的交差反応性を含む種々の因子に基づいて選択する。これらの選択されたペプチドの物理的及び化学的特性（例えば、溶解度、安定性）を試験してそれらのペプチドが治療用組成物中で用いるのに適当であるか否か或はそれらのペプチドがここに記載した

ように改変を必要とするか否かを決定する。これらの選択したペプチド又は選択した改変したペプチドがヒトT細胞を刺激する（例えば、増殖、リンホカイン分泌を誘導する）能力を測定する。

更に、この発明の好適なT細胞エピトープ含有ペプチドは、免疫グロブリンE (IgE) に結合しないか又はそのペプチドが導かれた蛋白質アレルゲンがIgEに結合するよりも実質的に低い程度でIgEに結合する。標準的な免疫療法の主要な合併症は、アナフィラキシー等のIgE媒介の応答である。免疫グロブリンEは、マスト細胞若しくは好塩基球上のIgEへの抗原の結合及び架橋並びにメディエーター（例えば、ヒスタミン、セロトニン、エオシン好性走化性因子）の放出から生じるアナフィラキシー反応のメディエーターである。従って、CryjIに感受性の個人の集団の相当のパーセンテージにおけるアナフィラキシーは、免疫療法において、CryjIアレルゲンに感受性の個人の集団の相当のパーセンテージ（例えば、少なくとも75%）においてIgEと結合せず、又は、IgEに結合してもかかる結合がマスト細胞若しくは好塩基球からのメディエーターの放

出を生じないペプチドを利用することによって回避することが出来る。アナフィラキシーの危険は、免疫療法において、IgE結合の減少したペプチドを利用することにより減じることが出来る。更に、最小 IgE刺激活性を有するペプチドは、治療効果に対して望ましい。最小 IgE刺

激活性とは、天然のCryjI蛋白質アレルゲンにより刺激されたIgE産生及び／又はIL-4産生の量より少ないIgE産生のことをいう。

この発明のT細胞エピトープ含有ペプチドは、杉花粉感受性の個人に投与したとき、その個人のアレルゲンに対するアレルギー応答を調節することが出来る。特に、CryjIの少なくとも1つのT細胞エピトープ又はCryjIから導かれる少なくとも2つの領域（それぞれ、少なくとも1つのT細胞エピトープを含む）を含むこの発明のペプチドは、杉花粉に感受性の個人に投与したときに、その個人のアレルゲンに対するT細胞応答を調節することが出来る。

この発明の好適な単離したペプチドは、杉花粉アレルゲンCryjIの少なくとも1つのT細胞エピトープを含み、従って、そのペプチドは、少なくとも約7アミノ酸残基を含む。治療効果の目的のためには、この発明の好適な治療用組成物は、好ましくは、CryjIの少なくとも2つのT細胞エピトープを含み、従って、このペプチドは、少なくとも約8アミノ酸残基好ましくは少なくとも約15アミノ酸残基を含む。更に、この発明の好適な単離したペプチドを含む治療用組成物は、好ましくは、杉花粉に感受性の個人にその組成物を投与する治療管理がその蛋白質アレルゲンに対して寛容化されたその個人のT細胞を生じるように、十分なパーセンテージの完全蛋白質アレルゲンのT細胞エピトープを含む。約45アミ

ノ酸残基長まで最も好ましくは約30アミノ酸残基長までを含むこの発明の合成により生成したペプチドは、長さの増加はペプチド合成を困難にするので、特に望ましい。この発明のペプチドは又、上述のように組換えにより生成することも出来、45アミノ酸以上のペプチドは組換えにより生成するのが好ましい。

好適ペプチドは、CryjI蛋白質アレルゲン内の主要T細胞反応性領域（ここでは、リージョン1、リージョン2、リージョン3、リージョン4及びリージョン

5とよぶ)の全部又は一部を含む。T細胞活性の各主要領域を後述のように定義し、図4 a～bに示す。リージョン1は、CryjIのアミノ酸残基1～50を含み；リージョン2は、CryjIのアミノ酸残基61～120を含み；リージョン3は、CryjIのアミノ酸残基131～180を含み；リージョン4は、CryjIのアミノ酸残基191～280を含み；リージョン5は、CryjIのアミノ酸残基291～353を含む。図4 a～bに示すように、各リージョン内の好適な主要T細胞反応性領域は、アミノ酸残基1～40；アミノ酸残基81～110；アミノ酸残基151～180；アミノ酸残基191～260及びアミノ酸残基291～330を含む。

治療目的に用い得るCryjI蛋白質アレルゲンから導かれたペプチドは、次のペプチドの全部又は一部を含む：CJ1-1、CJ1-2、CJ1-3、CJ1-4、CJ1-7、CJ1-8、CJ1-9、CJ1-10、

CJ1-11、CJ1-12、CJ1-14、CJ1-15、CJ1-16、CJ1-17、CJ1-18、CJ1-19、CJ1-20、CJ1-21、CJ1-22、CJ1-23、CJ1-24、CJ1-25、CJ1-26、CJ1-27、CJ1-28、CJ1-30、CJ1-31、CJ1-32、CJ1-33、CJ1-34及びCJ1-35（ここに、このペプチドの部分は、好ましくは、図14に示すように、それが導かれたペプチドの平均T細胞刺激インデックス以上の平均T細胞刺激インデックスを有する）。更に好ましくは、治療目的に用い得るCryjI蛋白質アレルゲンから導かれたペプチドは、図14に示すように、次のペプチドの全部又は一部を含む：CJ1-2、CJ1-9、CJ1-10、CJ1-16、CJ1-17、CJ1-20、CJ1-22、CJ1-23、CJ1-24、CJ1-25、CJ1-26、CJ1-27、CJ1-30、CJ1-31、CJ1-32及びCJ1-35。

更に、CryjI蛋白質から導かれた他の好適ペプチドは、図18に示すように、次のペプチドを含む：CJ1-41、CJ1-41.1、CJ1-41.2、CJ1-41.3、CJ1-42、CJ1-42.1、CJ1-42.2、CJ1-43、CJ1-43.1、CJ1-43.6、CJ1-43.7、CJ1-43

. 8、CJ1-43. 9、CJ1-43. 10、CJ1-43. 11、CJ1-43. 12、CJ1-45、

CJ1-45. 1、CJ1-45. 2、CJ1-44、CJ1-44. 1、CJ1-44. 2及びCJ1-44. 3。この発明の他の好適な抗原性ペプチドは、1つより多くのリージョンを含んで良い（即ち、図4a～bに示すCryjIのアミノ酸配列のアミノ酸151～352の全部又は一部）。

本発明の1つの具体例は、この蛋白質アレルゲンの少なくとも1つのT細胞エピトープを含み且つ式X_n-Y-Z_mを有するCryjIのペプチド若しくはその部分を叙述する。この式により、Yは、CJ1-1、CJ1-2、CJ1-3、CJ1-4、CJ1-7、CJ1-8、CJ1-9、CJ1-10、CJ1-11、CJ1-12、CJ1-14、CJ1-15、CJ1-16、CJ1-17、CJ1-18、CJ1-19、CJ1-20、CJ1-21、CJ1-22、CJ1-23、CJ1-24、CJ1-25、CJ1-26、CJ1-27、CJ1-28、CJ1-30、CJ1-31、CJ1-32、CJ1-33、CJ1-34及びCJ1-35よりなる群から選択するアミノ酸配列であり、好ましくは、CJ1-2、CJ1-9、CJ1-10、CJ1-16、CJ1-17、CJ1-20、CJ1-22、CJ1-23、CJ1-24、CJ1-25、CJ1-26、CJ1-27、CJ1-30、CJ1-31、CJ1-32及びCJ1-35よりなる群から選択するアミノ酸配列である。更に、X_nは、こ

の蛋白質アレルゲンのアミノ酸配列中のYのアミノ末端に隣接するアミノ酸残基であり、Z_mは、この蛋白質アレルゲンのアミノ酸配列中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸残基である。この式において、nは0～30であり、mは0～30である。好ましくは、このペプチド若しくはその部分は、図14に示すように、Yの平均T細胞刺激インデックス以上の平均T細胞刺激インデックスを有する。

本発明の他の具体例は、少なくとも2つの領域（それぞれ、CryjIの少なくとも1つのT細胞エピトープを含み、従って、各領域は少なくとも約7アミノ酸残

基を含む) を含むペプチドを提供する。これらの少なくとも 2 つの領域を含むペプチドは、CryjIアレルゲンの所望するだけ多くのアミノ酸残基を含むことが出来、好ましくは少なくとも約 14、一層好ましくは約 30、最も好ましくは少なくとも約 40 アミノ酸残基を含むことが出来る。所望であれば、これらの領域のアミノ酸配列を生成し、リンカーにより繋いで抗原提示細胞によるプロセッシングに対する感受性を増加させることが出来る。かかるリンカーは、任意の非エピトープアミノ酸配列又は他の適当な架橋若しくは結合剤であってよい。少なくとも 2 つの領域(それぞれ、少なくとも 1 つの T 細胞エピトープを含む) を含む好適ペプチドを得るために、これらの領域を、アレルゲン中のこれらの領域の天然の構成と異なった構成で配置する。例えば、T 細胞エピトープを

含むこれらの領域を、非隣接的構成で配置することが出来、好ましくは同じ蛋白質アレルゲンから導かれ得る。非隣接的とは、T 細胞エピトープを含む領域の配置であって、それらの領域が導かれた蛋白質アレルゲン中に存在するアミノ酸配列の配置と異なる配置として定義される。更に、T 細胞エピトープを含む非隣接領域を非逐次的順序(例えば、T 細胞エピトープを含む領域が誘導される天然の蛋白質アレルゲン(アミノ酸はアミノ末端からカルボキシ末端まで配置されている)のアミノ酸の順序と異なる順序で)で配置することが出来る。1 つのペプチドは、少なくとも 15%、少なくとも 30%、少なくとも 50% 又は 100% までの CryjI の T 細胞エピトープを含み得る。

個々のペプチド領域を生成し、試験をして、どの領域が CryjI に特異的な免疫グロブリン E と結合するのか及びかかる領域のどれがマスト細胞若しくは好塩基球からのメディエーター(例えば、ヒスタミン)の放出を引き起こすのかを決定することが出来る。試験したアレルギー性血清の約 10 ~ 15% より多くにおいて免疫グロブリン E に結合し且つマスト細胞若しくは好塩基球からのメディエーターの放出を引き起こすことが見出されたそれらのペプチドは、好ましくは、この発明の好適ペプチドを形成するために配置されるペプチド領域に含まれない。

更に、この発明のペプチドの領域は、好ましくは、上

述のCryjI内の好適な主要T細胞反応性領域（即ち、リージョン1～5）又は上述の各リージョン内の好適な主要T細胞反応性領域（即ち、残基1～40、81～110、151～180、191～260及び291～330からのアミノ酸）の全部又は一部を含む。例えば、ある領域はリージョン1（アミノ酸残基1～51）の全部又は一部を含み、ある領域はリージョン2（アミノ酸残基61～120）の全部又は一部を含み得る。この発明のペプチドは、これらのリージョン（即ち、リージョン1～5）の2つ以上の全部又は一部を含み得て、その結果の好適ペプチドはIgEに結合せず且つマスト細胞若しくは好塩基球からのメディエーターの放出を引き起こさない。CryjIから導かれた好適ペプチドは、リージョン3、リージョン4及びリージョン5を含み、適宜リージョン1及びリージョン2を含む。更に、もしこれらのリージョンの1つがIgEと結合し且つマスト細胞若しくは好塩基球からのメディエーターの放出を引き起こすことが見出されたならば、このペプチドは、かかるリージョンを含まずに、IgEに結合せず又はマスト細胞若しくは好塩基球からのメディエーターの放出を引き起こさないようなリージョンから導かれた種々の領域を含むのが好ましい。

好適領域の例は、次を含む：CJ1-1、CJ1-2、CJ1-3、CJ1-4、CJ1-7、CJ1-8、CJ1-9、CJ1-10、CJ1-11、CJ

1-12、CJ1-14、CJ1-15、CJ1-16、CJ1-17、CJ1-18、CJ1-19、CJ1-20、CJ1-21、CJ1-22、CJ1-23、CJ1-24、CJ1-25、CJ1-26、CJ1-27、CJ1-28、CJ1-30、CJ1-31、CJ1-32、CJ1-33、CJ1-34、CJ1-35、CJ1-41、CJ1-41.1、CJ1-41.2、CJ1-41.3、CJ1-42、CJ1-42.1、CJ1-42.2、CJ1-43.1、CJ1-43.6、CJ1-43.7、CJ1-43.8、CJ1-43.9、CJ1-43.10、CJ1-43.11、CJ1-43.12、CJ1-45.1、CJ1-45.2、CJ1-44.1、CJ1-44.2及びCJ1-44.3（かかる領域のアミノ酸配列を図13及び18に示す）、又は少なくとも1つのT細胞エピトープ

を含む該領域の部分。

好適ペプチドは、2つ以上の領域（各領域は、上述の好適な主要T細胞反応性領域の全部又は一部を含む）の種々の組合せを含む。好適ペプチドは、次を含む2つ以上の領域（各領域は、図13に示すアミノ酸配列を有する）の組合せを含む：

C J 1 - 1 、 C J 1 - 2 及び C J 1 - 3 ；

C J 1 - 1 及び C J 1 - 2 ；

C J 1 - 9 及び C J 1 - 1 0 ；

C J 1 - 1 4 、 C J 1 - 1 5 、 C J 1 - 1 6 及び C J 1 - 1 7 ；

C J 1 - 2 0 、 C J 1 - 2 1 、 C J 1 - 2 2 、 C J 1 - 2 3 ；

C J 1 - 2 0 、 C J 1 - 2 2 及び C J 1 - 2 3 ；

C J 1 - 2 2 及び C J 1 - 2 3 ；

C J 1 - 2 2 、 C J 1 - 2 3 及び C J 1 - 2 4 ；

C J 1 - 2 4 及び C J 1 - 2 5 ；

C J 1 - 3 0 、 C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ；

C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ；

C J 1 - 2 2 、 C J 1 - 2 3 、 C J 1 - 1 6 及び C J 1 - 1 7 ；

C J 1 - 2 2 、 C J 1 - 2 3 、 C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ；

C J 1 - 1 6 、 C J 1 - 1 7 、 C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ；

C J 1 - 9 、 C J 1 - 1 0 及び C J 1 - 1 6 ；

C J 1 - 1 6 及び C J 1 - 1 7 ；

C J 1 - 1 7 、 C J 1 - 2 2 及び C J 1 - 2 3 ；

C J 1 - 1 6 、 C J 1 - 1 7 及び C J 1 - 2 0 ；

C J 1 - 3 1 、 C J 1 - 3 2 及び C J 1 - 2 0 ；

C J 1 - 2 2 、 C J 1 - 2 3 、 C J 1 - 1 、 C J 1 - 2 及び C J 1 - 3 ；

C J 1 - 1 6 、 C J 1 - 1 7 、 C J 1 - 2 2 及び C J 1 - 2 3 、 C J 1 - 3 1 及び

C J 1 - 3 2 ；

C J 1 - 9、C J 1 - 1 0、C J 1 - 1 6、C J 1 - 1 7、C J 1 - 2 2 及び
C J 1 - 2 3；
C J 1 - 9、C J 1 - 1 0、C J 1 - 1 6、C J 1 - 1 7、C J 1 - 3 1 及び
C J 1 - 3 2；
C J 1 - 9、C J 1 - 1 0、C J 1 - 2 2、C J 1 - 2 3、C J 1 - 3 1 及び
C J 1 - 3 2；
C J 1 - 9、C J 1 - 1 0、C J 1 - 1 6、C J 1 - 1 7、C J 1 - 2 2、C
J 1 - 2 3、C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2；
C J 1 - 1、C J 1 - 2、C J 1 - 1 6、C J 1 - 1 7、C J 1 - 2 2 及び C
J 1 - 2 3；
C J 1 - 2 2、C J 1 - 2 3、C J 1 - 2 4、C J 1 - 9 及び C J 1 - 1 0；
C J 1 - 2 2、C J 1 - 2 3、C J 1 - 2 4、C J 1 - 9 及び C J 1 - 1 0、
C J 1 - 1 6 及び C J 1 - 1 7；
C J 1 - 2 2、C J 1 - 2 3、C J 1 - 2 4、C J 1 - 1 6 及び C J 1 - 1 7
；
C J 1 - 2 2、C J 1 - 2 3、C J 1 - 2 4、C J 1 - 9 及び C J 1 - 1 0、
C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2；
C J 1 - 2 2、C J 1 - 2 3、C J 1 - 2 4、C J 1

- 9 及び C J 1 - 1 0、C J 1 - 1 6、C J 1 - 1 7、C J 1 - 3 1 及び C J 1
- 3 2；及び

C J 1 - 2 2、C J 1 - 2 3、C J 1 - 2 4、C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2
。

本発明の範囲内の単離したCryjI蛋白質又はCryjIのペプチドを、杉花粉に対するアレルギー反応を治療し及び予防する方法において用いることが出来る。従つて、本発明の1つの面は、少なくとも1つのT細胞エピトープを好ましくは少なくとも2つのT細胞エピトープを含むCryjIのペプチド及び製薬上許容し得るキ

キャリアー若しくは希釈剤を含む治療用組成物を提供する。他の面において、この治療用組成物は、製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤及び少なくとも2つの領域（各領域は、CryjIの少なくとも1つのT細胞エピトープを含む）を含むペプチドを含む。

好適な治療用組成物は、杉花粉アレルゲンに感受性の個人へその組成物を投与する治療管理がその個人のT細胞をその蛋白質アレルゲンに対して寛容にするよう、十分なパーセンテージのCryjIのT細胞エピトープを含む。更に好ましくは、この組成物は、cryjIのT細胞反応性の少なくとも約40%、一層好ましくは少なくとも約60%がこの組成物に含まれるように、十分なパーセンテージのT細胞エピトープを含む。かかる組成物を個人に投与して杉花粉又は杉花粉アレルゲンと免疫的に交差反応性のアレルゲンに対する感受性を治療し又は予防

することが出来る。

本発明の更に別の面において、少なくとも2つのペプチド（それぞれ、CryjIの少なくとも1つのT細胞エピトープを含む）を含む組成物（例えば、少なくとも2つのペプチドの物理的混合物）を提供する。かかる組成物を、製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を伴う治療用組成物の形態で投与することが出来る。治療上有効な量の1種以上のかかる組成物を、杉花粉に感受性の個人に同時に又は逐次的に投与することが出来る。

同時に又は逐次的に投与することの出来るペプチドの好適組成物及び好適組合せ（図13に示すアミノ酸配列を有するペプチドを含む）は、次の組合せを含む：

C J 1 - 1 、 C J 1 - 2 及び C J 1 - 3 ；

C J 1 - 1 及び C J 1 - 2 ；

C J 1 - 9 及び C J 1 - 1 0 ；

C J 1 - 1 4 、 C J 1 - 1 5 、 C J 1 - 1 6 及び C J 1 - 1 7 ；

C J 1 - 2 0 、 C J 1 - 2 1 、 C J 1 - 2 2 及び C J 1 - 2 3 ；

C J 1 - 2 0 、 C J 1 - 2 2 及び C J 1 - 2 3 ；

C J 1 - 2 2 及び C J 1 - 2 3 ;
 C J 1 - 2 2 , C J 1 - 2 3 及び C J 1 - 2 4 ;
 C J 1 - 2 4 及び C J 1 - 2 5 ;
 C J 1 - 3 0 , C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ;
 C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ;
 C J 1 - 2 2 , C J 1 - 2 3 , C J 1 - 1 6 及び C J 1 - 1 7 ;
 C J 1 - 2 2 , C J 1 - 2 3 , C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ;
 C J 1 - 1 6 , C J 1 - 1 7 , C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ;
 C J 1 - 9 , C J 1 - 1 0 及び C J 1 - 1 6 ;
 C J 1 - 1 6 及び C J 1 - 1 7 ;
 C J 1 - 1 7 , C J 1 - 2 2 及び C J 1 - 2 3 ;

 C J 1 - 1 6 , C J 1 - 1 7 及び C J 1 - 2 0 ;
 C J 1 - 3 1 , C J 1 - 3 2 及び C J 1 - 2 0 ;
 C J 1 - 2 2 , C J 1 - 2 3 , C J 1 - 1 , C J 1 - 2 及び C J 1 - 3 ;
 C J 1 - 1 6 , C J 1 - 1 7 , C J 1 - 2 2 , C J 1 - 2 3 , C J 1 - 3 1 及
 ビ C J 1 - 3 2 ;
 C J 1 - 9 , C J 1 - 1 0 , C J 1 - 1 6 , C J 1 - 1 7 , C J 1 - 2 2 及び
 C J 1 - 2 3 ;
 C J 1 - 9 , C J 1 - 1 0 , C J 1 - 1 6 , C J 1 - 1 7 , C J 1 - 3 1 及び
 C J 1 - 3 2 ;
 C J 1 - 9 , C J 1 - 1 0 , C J 1 - 2 2 , C J 1 - 2 3 , C J 1 - 3 1 及び
 C J 1 - 3 2 ;
 C J 1 - 9 , C J 1 - 1 0 , C J 1 - 1 6 , C J 1 - 1 7 , C J 1 - 2 2 , C
 J 1 - 2 3 , C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ;
 C J 1 - 1 , C J 1 - 2 , C J 1 - 1 6 , C J 1 - 1 7 , C J 1 - 2 2 及び C
 J 1 - 2 3 ;
 C J 1 - 2 2 , C J 1 - 2 3 , C J 1 - 2 4 , C J 1 - 9 及び C J 1 - 1 0 ;
 C J 1 - 2 2 , C J 1 - 2 3 , C J 1 - 2 4 , C J 1 - 9 , C J 1 - 1 0 , C

J 1 - 1 6 及び C J 1 - 1 7 ;

C J 1 - 2 2 , C J 1 - 2 3 , C J 1 - 2 4 , C J 1 - 1 6 , C J 1 - 1 7 ,

C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ;

C J 1 - 2 2 , C J 1 - 2 3 , C J 1 - 2 4 , C J 1 - 1 6 及び C J 1 - 1 7

;

C J 1 - 2 2 , C J 1 - 2 3 , C J 1 - 2 4 , C J 1 - 9 , C J 1 - 1 0 , C
J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ;

C J 1 - 2 2 , C J 1 - 2 3 , C J 1 - 2 4 , C J 1 - 9 , C J 1 - 1 0 , C
J 1 - 1 6 , C J 1 - 1 7 , C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2 ; 及び

C J 1 - 2 2 , C J 1 - 2 3 , C J 1 - 2 4 , C J 1 - 3 1 及び C J 1 - 3 2

。

この発明を、更に、下記の非制限的実施例により説明する。

実施例 1

杉花粉アレルゲン (CryjI) の精製

以下は、天然形態の主要アレルゲン CryjIを生化学的に精製するためになされた仕事の説明である。この精製は、刊行された手順 (Yasueda等、J. Allergy Clin. Immunol. 71: 77, 1983) を改変したものである。

日本国から得た 100 g の杉花粉 (ワシントン、Spokane在、HollisterStir) を 1 L のジエチルエーテル中で 3 回脱脂し、濾過後に花粉を集めてエーテルを真空中で乾燥させた。

脱脂した花粉を、50 mM トリス HCl (pH 7.8) 、0.2 M NaCl 及びプロテアーゼ阻害剤

(2 μg / ml (終濃度) 大豆トリプシン阻害剤、1 μg / ml (終濃度) ロイペプチド、1 μg / ml (終濃度) ペプスタチン及び 0.17 mg / ml (終濃度) フェニルメチルスルホニルフルオリド) を含む 2 L の抽出用緩衝液中で 4 °C で一晩抽出した。不溶性物質を 1.2 L の抽出用緩衝液で 4 °C で一晩再抽出し、両抽出物を合わせて、抽出用緩衝液で平衡化した Whatman DE-52 D E A E セルロ

ース（乾重量200g）を用いてバッチ式吸収により色素脱失した。

色素脱失した物質を、次いで、80%饱和（4°C）の硫安沈澱により分画して、低分子量の物質の多くを除去した。その結果の部分精製したCryjIを、PBS緩衝液にて透析してT細胞研究に用い（実施例6参照）又は下記のように更なる精製（生化学的又はモノクローナルアフィニティーコロマトグラフィー）にかけた。

このCryjIに富む物質を、次いで、プロテアーゼ阻害剤を加えた50mM 酢酸ナトリウム（pH 5.0）を用いて、50mM 酢酸ナトリウム（4°CでpH 5.0）に対して透析した。この試料を、次に、4°Cでプロテアーゼ阻害剤を加えた50mM 酢酸ナトリウム（pH 5.0）で平衡化した100mlのDEAEセルロースカラム（Whatman DE-52）に加えた。未結合物質（塩基性蛋白質）を、次いで、プロテアーゼ阻害剤を加えた4°Cの10mM 酢酸ナトリウム（pH 5.0）で平衡化した50mlのカチオン交換カラム（Whatman CM

-52）に加えた。CryjIは、0.3M NaClの直線的勾配の初期画分に溶出された。このCryjI富化物質を凍結乾燥し、次いで、300mlのSuperdex 75カラム（Pharmacia）上でのFPLC（25°Cの10mM 酢酸ナトリウム（pH 5.0）、流量30ml／時）により精製した。

精製したCryjIを、更に、0～1M NaCl（25°C）の直線的勾配を用いたFPLC S-Sepharose 16/10カラムクロマトグラフィー（Pharmacia）に加えた。主要ピークとして溶出したCryjIを第2のゲル濾過クロマトグラフィーにかけた。FPLC Superdex 75カラム（60cm当り2.6）（ニュージャージー、Piscataway在、Pharmacia）を、10mM 酢酸ナトリウム（pH 5.0）の下降流（流量30ml／時、25°C）で溶出した。図1aは、このゲル濾過クロマトグラフィーを示す。CryjIのみが検出された（図1b、レーン2～8）。CryjIは、銀染色を用いるSDS-PAGEによる分析で3つのバンドに分画された（図1b）。図1bに示すように、図1aに示した主要ピークからの画分のSDSPAGE（12.5%）分析を還元条件下で行なった。ゲルを、Bio-Radの銀染色キットを用いて銀染色した。これらの各レーン内の試料は、次のとおりで

あった：レーン1、オバルブミン（43,000 kDa）、カルボニックアンヒドライゼ（29,000 kDa）及び α -ラクトグロブリン（18,400 kDa）を含む

予備染色した標準蛋白質（Gibco BRL）；レーン2、画分36；レーン3 画分37；レーン4 画分38；レーン5 画分39；レーン6 画分41；レーン7 画分43及びレーン8 画分44。すべての画分を図1aに示す。

これらの蛋白質を、マウスモノクローナル抗体CBF2を用いるウエスタンプロットによっても分析した（図2）。図2に示すように、Superdex 75（図1）から精製した画分36（レーン1）、画分39（レーン2）及び画分43（レーン3）のアリコートをSDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロース上にエレクトロプロットし且つmAb CBF2をプローブとして調べた。ビオチン化ヤギ抗マウスIgを第2抗体として用い、結合した抗体を¹²⁵I-ストレプトアビシンにより示した。モノクローナルCBF2は、D. Klapper博士（ノースカロライナ、Hill在、Chapel）によりブタクサアレルゲンAmb a Iに対して高められた。Amb a IとCryjIの配列間の相同性の故に、Amb a Iに対して高められた抗体の幾つかをCryjIとの反応性について試験した。これらの結果は、ELISA及びウエスタンプロットにより検出されたように、CBF2が変性したCryjIを認識することを示した。更に、ウエスタンプロットは又、CBF2によつては、予想される分子量範囲にはCryjIを除いて、他のバンドは検出されないことをも示した。これらの結果は、蛋白質の配列決定から見出されたことと一致

した。画分44及び39（図1b）をN末端配列決定にかけたが、CryjIの配列しか検出されなかった。

要するに、花粉抽出物から分子量の異なる3つのCryjIイソ型が精製された。これらのSDS-PAGEで評価した分子量は、還元及び非還元条件の両方において40～35 kDaにわたった。これらのイソ型の等電点は約9.5～8.6であり、平均pI 9.0である。N末端の20アミノ酸配列は、これらの3つのバンドにおいて同じであり且つ以前に公表されたCryjIの配列（Taniai等、前出

) と同一であった。これらの3つのイソ型は、すべて、15人のアレルギー患者血漿を用いるCryjIの種々の精製したサブ画分のアレルギー血清滴定で示されるように、モノクローナル抗体CBF2により認識される。それらは、すべてアレルギー患者のIgEと結合する(図3)。これらのイソ型の分子量及び等電点の差異は、部分的に、翻訳後修飾例えばグリコシレーション、リン酸化又は脂質含量のためであろう。これらの異なるイソ型がプロテアーゼ分解のためであるという可能性は、抽出及び精製において4種の異なるプロテアーゼ阻害剤を用いたという事実によりありそうにもないが、現時点では排除することは出来ない。他の可能性は、cDNAクローニング研究においてはCryjI蛋白質の唯一つの主要型しか検出されなかった(実施例4参照)が、遺伝子の多形又はmRNAの交換されたスプライシングのためということがあり得よう。

天然cryjI又は組換えCryjIを精製するために用い得る他のアプローチはイムノアフィニティークロマトグラフィーである。この技術は、モノクローナル抗体と抗原との間の相互作用の特性のために非常に選択的な蛋白質精製を与える。CryjI反応性モノクローナル抗体を生成する目的のために、雌のBalb/cマウスをJackson Labsから入手した。各マウスを初めに完全フロイントアジュvantに乳化させた70~100μgの精製した天然CryjI(純度>99%、図1bに示す、下方のバンド)で腹膜内免疫化した。PBS中の10μgの精製した天然CryjIの更なる静脈注射を、最初の注射後54日目に行なった。3日後に脾臓を取り出して、ミエローマとの融合を、ミエローマ系統SP2.0を用いて、記載された(Current Protocols in Immunology, 1991, Coligan等編)ようにしておこなった。これらの細胞を10%ウシ胎児血清(Hybrimax)、ヒポキサンチン及びアザセリン中で培養し、ハイブリドーマ細胞のコロニーを含むウェルを、抗原結合ELISAを用いて、抗体産生についてスクリーニングした。

陽性のウェルからの細胞を、3/10の細胞/ウェルにて10%ウシ胎児血清(Hybrimax)、ヒポキサンチン中でクローン化し、陽性クローンを再度ヒポキサンチン培地中でサブクローン化した。捕獲ELISA(実施例7参照)を、第2及び第3のスクリーニングに用いた。このアッセイは、天然蛋白質を認識するク

ローンが選択

され、それ故、イムノアフィニティー精製に有用であり得るという利点を与える。例えば、2つのモノクローナル抗体（4B11、8B11）を生成した。これらの抗体を、製造者の手順に従つて、Gammabind G Sepharose（ニュージャージー、Piscataway在、Pharmacia）により生成し、Pharmaciaにより記載された手順に従つてシアノゲンブロミド活性化Sepharose 4B（ニュージャージー、Piscataway在、Pharmacia）に固定化した。CryjIを含む硫安調製物をこの樹脂に加え、未結合物質を多量のPBSで洗った。CryjIを2カラム容積の0.1Mグリシン（pH 2.7）で溶出した。SDS PAGEにて泳動した溶出物画分の銀染色は、CryjIが殆ど均質に精製されたことを示した。これらの画分は、検出可能なレベルのCryhIIを含まない。MAb 8B11を固定化する他の方法も又試験した。類似の結果が、ジメチルピメリミデートによりGammabind G Sepharoseに共有架橋結合された精製したMAb 8B11（Schneider C. 等、J. Biol. Chem. (1982)257巻：10766-10769）を用いて得られた。しかしながら、Affi-gel 10（カリフォルニア、Richmond在、Biorad）に共有架橋結合された精製したMAb 8B11を用いた実験は、モノクローナル抗体の90%より多くがAffi-gel 10に共有結合で結合されたにもかかわらず、その樹脂にて生成されたCryjIの収率は、シアノゲンブロミド活性化されたSepharose 4Bに架橋されたMAb 8B11から精製されたものより有意に低いという

ことを示した（データは示さない）。それにもかかわらず、これらの種々の樹脂上に固定化されたモノクローナル抗体から精製したCryjIは、やはり無傷であり且つ捕獲ELISAによりMAb 8B11及び4B11によって認識され得る。従つて、これらのMAbは、花粉抽出物からのCryjIの精製に有用な道具を提供する。同様に、組換えCryjIに結合するモノクローナル抗体も又、イムノアフィニティークロマトグラフィーのために有用であり得る。更に、これらの生成されたモノクローナル抗体は、診断目的にも有用であり得る。CryjIのこれらの異なるイソ型に対する幾らかの特異性を示し、それ故、これらのイソ型を特性決定す

るための有用な道具を与えるであろう異なるM A bを高めることも可能であろう。

実施例2

杉花粉からのRNAの抽出の試み

市販の、脱脂してないCryptomeria japonica(杉)の花粉(ワシントン、Seattle在、Hollister Stier)からRNAを得るために多くの試みが為された。最初、試料を4Mグアニジン緩衝液中に懸濁させて溶解し、液体窒素下ですり潰して、5. 7M塩化セシウム中で超遠心分離によりペレット化するSambrook等、Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor ニューヨーク

(1989) の方法を用いた。種々の量(3. 5及び10g)の花粉を、グアニジン溶解緩衝液中でその量を変えて(10及び25ml)試みた。セシウム中の遠心分離は、管の底に粘性の物質を生じたが、それからRNAペレットを回収することは出来なかった。脱脂したAmbrosia artemisiifolia(ブタクサ)花粉(ノースカロライナ、Lenior在、Greer Laboratories)から、このプロトコールを用いてRNAを得ることは可能であるにもかかわらず、Cryptomeria japonica花粉をグアニジン抽出前にアセトンで脱脂しても、A₂₆₀の吸収で測定した限り何らのRNAをも生成しなかった。

Sambrook等、前出の方法によるRNAの酸フェノール抽出を、Cryptomeria japonica花粉から試みた。花粉を4. 5Mグアニジン溶液中ですり潰し且つ剪断し、2M酢酸ナトリウムを加えて酸性化し、そしてクロロホルムを加えた水飽和フェノールで抽出した。沈殿後、ペレットを4M塩化リチウムで洗い、10mMトリス／5mM EDTA／1% SDSに再溶解させ、クロロホルム抽出し、そしてNaCl及び無水エタノールで再沈殿させた。この手順を用いたのでは、Ambrosia artemisiifolia RNAを抽出することは出来たが、Cryptomeria japonica RNAの抽出は出来なかった。

次に、4gのCryptomeria japonica花粉を10mlの抽出用緩衝液(50mMトリス(pH9.0)、0.2M NaCl、10mM酢酸マグネシウム及

び

ジエチルピロカーボネート (D E P C) (0. 1 % にする)) に懸濁し、ドライアイス上で乳鉢と乳棒ですり潰し、1 % SDS、10 mM EDTA 及び 0.5 % N-ラウロイルサルコシンと共に遠心管に移してこの混合物を温フェノールで 5 回抽出した。最後の遠心分離の後に水相を回収して 2.5 倍容の無水エタノールを加え、この混合物を一晩 4 °C でインキュベートした。ペレットを遠心分離により回収し、65 °C に加熱することにより 1 ml の d H₂O に再懸濁し、そして 0.1 容の 3 M 酢酸ナトリウム及び 2.0 容のエタノールの添加により再沈澱させた。A₂₆₀の吸収及びゲル電気泳動により鑑定した限りにおいて、このペレットにおいては検出可能な RNA は回収されなかった。

最後に、500 mg の *Cryptomeria japonica* 花粉をドライアイス上で乳鉢と乳棒ですり潰して 0.2 M NaCl、1 mM EDTA、1 % SDS を加えた 5 ml の 50 mM トリス (pH 9.0) (以前に Frankis 及び Mascarhenas (1980) Ann. Bot. 45: 595-599 に記載されたように 0.1 % D E P C で一晩処理したもの) に懸濁させた。フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール (2 : 24 : 1 で混合) で 5 回抽出した後に、水相から物質を、0.1 容の 3 M 酢酸ナトリウム及び 2 容のエタノールを用いて沈澱させた。そのペレットを、遠心分離で回収し、d H₂O に再懸濁させて 65 °C まで加熱して沈澱物質を溶解させた。塩化リチウムを用いる

更なる沈澱は行なわなかった。A₂₆₀の吸収及びゲル電気泳動により測定した限りにおいて、検出可能な RNA はなかった。

要するに、市販の花粉から RNA を回収することは不可能であった。RNA が貯蔵若しくは出荷の際に分解したのか、又はこの実施例で用いたプロトコールが実在する RNA を回収出来ないのかは分からぬ。しかしながら、新鮮な *Cryptomeria japonica* 花粉及び雄蕊を有する球果試料からは RNA が回収された（実施例 3 参照）。

実施例 3

杉花粉及び雄蘂を有する球果からのRNAの抽出及びCryjIのクローニング

Arnold Arboretum (マサチューセッツ、Boston) にある 1 本の *Cryptomeria japonica* (杉) の木から採集した新鮮な花粉及び雄蘂を有する球果試料を直ちにドライアイス上で凍結した。RNAを500mgの各試料から、本質的にFrankis 及びMascarhenas、前出により記載された様にして調製した。これらの試料をドライアイス上で乳鉢と乳棒ですり潰し、0.1%DEPCで一晩処理した0.2M NaCl、1ml EDTA、1% SDSを有する5mlの50mMトリス(pH9.0)に懸濁させた。フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール(25:24:1で混合)で5回抽出した後に、RNAを水相から、0.1容の2M 酢酸ナトリウム及

び2容のエタノールで沈殿させた。遠心分離によりペレットを回収し、dH₂Oに再懸濁させ、65℃に5分間加熱した。2mlの4M 塩化リチウムをRNA沈殿に加えて、それらを一晩0℃でインキュベートした。遠心分離によりRNAペレットを回収し、1mlのdH₂Oに再懸濁させ、再び3M 酢酸ナトリウム及びエタノールで一晩沈殿させた。最後のペレットを100μlのdH₂Oに再懸濁させて-80℃に貯蔵した。

第1鎖cDNAを、8μgの頭状花序及び4μgの花粉RNAから、市販のキット(cDNA合成システムキット、メリーランド、Gaithersburg在、BRL)を用いて、Gubler及びHoffman(1983)Gene₂₅: 263-269の方法に従ってオリゴdTプライミングで合成した。CryjIをコードするcDNAを、縮退オリゴヌクレオチドCP-1(配列5'-GATAATCCGATAGATA-3')を有し、ここに、3位のTはCでもよく、6位のTはCでもよく、9位のGはA、T若しくはCでもよく、12位のAはT若しくはCでもよく、15位のTはCでもよく、16位のAはTでもよく、17位のGはCでもよい；配列番号：3)及びプライマーEDT及びEDを用いて増幅する試みを行なった。プライマーEDTは、配列5'-GGAATTCTCTAGACTG CAGGTTTTTTTTTTT-3' (配列番号：24)を有する。プライマーEDは、配列5'-GGAATTCTCTAGACTGCAGGT-3' (配列番号：23)を有する。CP-1は、CryjIのアミノ末端の最初の6アミノ酸(A s p A s n P r o

I I e A s p S e r 、配列番号1のアミノ酸1～6)をコードする縮退したオリゴヌクレオチド配列である。EDTは、この遺伝子のポリAテールとハイブリダイズするであろう。すべてのオリゴヌクレオチドは、アラバマ、Huntsville在、Research Genetics, Inc.により合成された。ポリメラーゼ連鎖反応を、市販のキット(GeneAmp DNA増幅キット、コネチカット、Norwalk在、PerkinElmer Cetus)を用いて行ない、dNTPを含む10μlの10×緩衝液を1μgのCP-1及び1μgのED/EDTプライマー(ED: EDTのモル比3:1)、cDNA(20μlの第1鎖cDNA反応混合物の3～5μl)、0.5μlのAmpliTaqDNAポリメラーゼ及び蒸留水(100μlにする)と混合した。

これらの試料を、プログラム可能な温度制御装置(マサチューセッツ、Cambridge在、MJ Research, Inc.)を用いて増幅した。増幅の最初の5回は、94℃で1分間の変性、45℃で1.5分間のプライマーのテンプレートへのアニーリング及び70℃で2分間の鎖延長からなった。増幅の最後の20回は、上記のとおりの変性、55℃で1.5分間のアニーリング及び上記の通りの鎖延長からなった。次いで、この初期増幅の5パーセント(5μl)を、各1μgのCP-2(配列5'-GGGAATTCAATTGGGCGCAGAATGG-3'を有し、ここで11位のTはCでもよく、17位のGはA、T若しくはCでもよく、20位のGはAでもよく、23位のTはCでもよく、24位のG

はCでもよい)(配列番号:4)、ネストしたプライマー及びEDを用いる第2の増幅で用いた。プライマーCP-2中の配列5'-GGGAATT-3'(配列番号4の塩基1～8)は、クローニング目的のために加えられたEcoRI部位を表す。残りの縮退したオリゴヌクレオチド配列は、CryjIのアミノ酸13～18(A s n T r p A l a G l n A s n A r g、配列番号1のアミノ酸13～18)をコードする。多くのDNAバンドが、1%GTGアガロースゲル(ME、Rockport在、FMC)上で分離されたが、それらの何れもが、Sambrook等、前出の方法に従って行なったザーンプロットにおいて、³²P末端標識したプローブCP-3(配列番号:5)とハイブリダイズしなかった。従って、特定のCryjI DNAバンドを選択することは出来ず、このアプローチは中止した。CP-3は配列5'-CTGC

AGCCATTTCIACATTAAG-3' を有し、ここに、9位のAはGでもよく、12位のTはCでもよく、18位のAはGでもよく、21位のAはGでもよい（配列番号：5）。15位では、縮退を減じるためにG又はA又はT又はCの代りにイノシン（I）を用いている（Knoth等（1988）Nucleic Acids Res. 16: 10932）。プライマーカーポリマー中の配列5'-CTGCAG-3'（配列番号5の塩基1～6）は、クローニング目的のために加えられたPstI部位を表している。残りの縮退したオリゴヌクレオチド配列は、CryjIの内部配列からのアミノ酸Phenylalanine Valine Alanine Alanine Glycine（配列番号1の

アミノ酸327～332）をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列である。

第1のPCRも又、第1鎖cDNAにて、上記のように、CP-1（配列番号：3）及びCP-3（配列番号：5）を用いて行なった。第2のPCRは、最初の反応の5%を用いて、CP-2（配列番号：4）及びCP-3（配列番号：5）を用いて行なった。再び、多くのバンドが認められたが、それらの何れもが、サザーンプロットにおいて特異的にCryjIと同定され得ず、このアプローチも中止された。

次いで、二本鎖cDNAを、約4μg（花粉）及び8μg（頭状花序）のRNAから、市販のキット（cDNA合成システムキット、メリーランド、Gaithersburg在、BRL）を用いて合成した。フェノール抽出及びエタノール沈澱の後に、cDNAを、Rafnar等（1991）J. Biol. Chem. 266: 1229-1236；Frohman等（1990）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002；及びRoux等（1990）BioTech. 8: 48-57の方法に従って、改変アンカードPCR反応で用いるために、T4DNAポリメラーゼ（ウィスコンシン、Madison在、Promega）で鈍端化し、エタノール沈澱して自己アニールしたAT（配列番号：20）及びAL（配列番号：22）オリゴヌクレオチドに繋いだ。オリゴヌクレオチドATは、配列5'-GGGTCTAGAGGTACCGTCCGATCGATCATT-3'（配列番号：20）（Rafnar等、前出）を有する。オリゴヌクレオチドALは、配列5'-AATGATCGATGCT-3'（

配列番号：22）（Rafnar等、前出）を有する。CryjIのアミノ末端を、結合したcDNA（20μlの反応からの3μl）から、各1μgのオリゴヌクレオチドAP（配列番号：21）及び縮退したCryjIプライマーCP-7（配列5'-TTC ATICGATTCTGGGCCA-3'、8位のGはTでもよく、9位のAはGでもよく、12位のCはTでもよく、15位のGはA、T若しくはCでもよい）（配列番号：6）を用いて増幅した。縮退を減じるために、イノシン（I）を、6位で、G又はA又はT又はCの代りに用いている（Knoth等、前出）。縮退したオリゴヌクレオチドCP-7（配列番号：6）は、CryjIのアミノ末端（配列番号1のアミノ酸14～20）からのアミノ酸14～20（TrpAlaGlnAsnArgMetLys）をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列である。オリゴヌクレオチドAPは、配列5'-GGGTCTAGAGGTACCGTCCG-3'（配列番号：21）を有する。

第1のPCR反応を、ここに記載したようにして、行なった。次いで、この初期増幅の5パーセント（5μl）を、各1μgのAP（配列番号：21）及びCryjIプライマーCP-8（配列番号：7）内部でネストしたCryjIオリゴヌクレオチドプライマーを用いる第2増幅において用いた。プライマーCP-8は、配列5'-CCTGCAGCGATTCTGGGCCAAATT-3'を有し、ここに、9位のGはTでもよく、10位のAはGでもよく、13位のCはTでもよく、16位のGはA、T若しくはCでもよく、

23位のAはGでもよい（配列番号：7）。ヌクレオチド5'-CCTGCAG-3'（配列番号7の塩基1～7）は、クローニング目的のために加えられたPstI部位を表す。残りの縮退したオリゴヌクレオチド配列は、CryjIのアミノ末端からのCryjIのアミノ酸13～18（AsnTrpAlaGlnAsnArg、配列番号1のアミノ酸13～18）をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列である。主な増幅生成物は、エチジウムプロミド（EtBr）染色した3%アガロースゲル上で可視化したところ、約193塩基対のDNAバンドであった。

増幅したDNAを、逐次的なクロロホルム、フェノール及びクロロホルム抽出と、その後の0.5容の7.5酢酸アンモニウム及び1.5容のイソプロパノ-

ルでの-20°Cでの沈殿によって回収した。沈殿及び70%エタノールでの洗浄の後に、このDNAを、15μlの反応にてXba IとPst Iで同時に消化して調製用3%GTG NuSieve低融点ゲル（メイン、Rockport在、FMC）中で電気泳動した。適当な寸法のDNAバンドを、EtBr染色により可視化し、取り出して、市販の配列決定用キット（Sequenase kit, オハイオ、Cleveland在、U. S. Biochemicals）を用いて、ジデオキシチーンターミネーション法（Sanger等(1977)Proc. Natl. Acad. Sci. USA74: 54463-5476）により配列決定するために、適当にデザインしたM13mp18中に繋いだ。最初は、ライゲー

ション可能な物質は、雄蕊を有する球果由来のRNAからしか導けないと考えられた。しかしながら、引き続いての試験において、ライゲーション可能な物質が、花粉由来のRNA及び雄蕊を有する球果由来のRNAから生成したPCR生成物から回収され得ることが示された。

JC71.6とよばれるクローンは、CryjIの部分配列を含むことが見出された。これは、開示されたCryjIのNH₂末端配列（Taniai等、前出）に完全に同一である確実なCryjIのクローンであることが確認された。7位のアミノ酸は、米国特許4,939,239号に開示された配列と一致して、システイン(Cys)であることが決定された。アミノ酸の番号付けは、成熟蛋白質の配列に基いており、アミノ酸1は、CryjIのNH₂末端として開示されたアスパラギン酸(Asp)（Taniai等、前出）に対応する。開始メチオニンは、成熟蛋白質の第1アミノ酸に対してアミノ酸-21であることが見出された。開始メチオニンの位置は、上流のインフレームの終止コドンの存在により及び周囲の配列と植物コンセンサス配列（Lutcke等(1987)EMBO J. 6: 43-48により報告されたように、開始メチオニンを含む）との78%の相同性により支持された。

CryjI遺伝子の残りをコードしているcDNAを、第1のPCR反応で、結合したcDNAから、オリゴヌクレオチドCP-9（配列5'-ATGGATTCCCTTGCTTA-3'（配列番号：8）及びAP（配列番号：21）を用いて

クローン化した。オリゴヌクレオチドCP-9（配列番号：8）は、CryjIのリ

ーダー配列に由来するCryjIのアミノ酸Met Asp Ser Pro Cys Leu (配列番号1のアミノ酸-21～-16)を含み、部分的CryjIクローンJC76.1について決定されたヌクレオチド配列に基いている。

第2のPCR反応を、最初の増幅混合物の5%について、各1μgのAP (配列番号: 21) 及びCP-10 (配列5' -GGGAATTCGATAATCCCATAGACAGC-3' を有する) (配列番号: 9) ネストしたプライマーを用いて行なった。プライマーCP-10のヌクレオチド配列5' -GGGAATTC-3' (配列番号9の塩基1～8)は、クローニング目的のために加えられたEcoRI部位を表す。残りのオリゴヌクレオチド配列は、CryjIのアミノ酸1～6 (Asp Asn Pro Ile Asp Ser) (配列番号1のアミノ酸1～6)をコードし、部分的CryjIクローンJC76.1について決定されたヌクレオチド配列に基いている。この増幅したDNA生成物を、上記のように精製して沈殿させ、それから、EcoRI及びXbaIで消化して調製用1%低融点ゲル中で電気泳動した。主なDNAバンドを取り出して、配列決定のためにM13mp19及びpUC19に繋いだ。再びライゲーション可能な物質を、花粉由来のRNA及び雄薬を有する球果由来のRNAから生成したcDNAから回収した。pUC19JC91a及びpUC19JC91dとよば

れる2つのクローンを、全長配列決定のために選択した。それらは、続いて、同一配列であることが見出された。

DNAを、市販のキット (オハイオ、Cleveland在、U. S. Biochemicals) を用いて、ジデオキシチーンターミネーション法 (Sanger等、前出) により、配列決定した。両鎖を、M13順方向及び逆方向プライマー (マサチューセッツ、Beverly在、N. E. Biolabs) 及び内部シーケンシングプライマーCP-13 (配列番号: 10)、CP-14 (配列番号: 11)、CP-15 (配列番号: 12)、CP-16 (配列番号: 13)、CP-18 (配列番号: 15)、CP-19 (配列番号: 16) 及びCP-20 (配列番号: 17)を用いて、完全に配列決定した。CP-13は、配列5' -ATGCCTATGTACATTGC-3' (配列番号: 10)を有する。CP-13 (配列番号: 10)は、CryjIのアミノ酸82～87 (Me

t P r o M e t T y r I l e A l a) 配列番号 1 のアミノ酸 82 ~ 87) をコードする。CP-14は、配列 5' -GCAATGTACATAGGCAT-3' (配列番号: 11) を有し、CP-13 (配列番号: 10) の非コード鎖配列に対応する。CP-15は、CryjIのアミノ酸 169 ~ 174 (Ser Asn Ser Ser Asp Gly、配列番号 1 のアミノ酸 169 ~ 174) をコードする配列 5' -TCCAATTCTTCTGATGGT-3' (配列番号: 12) を有する。CP-16は、CryjIのアミノ酸 335 ~ 340 (Thr Pro Glu Leu Thr Lys) 配列番号 1 のアミノ酸 335 ~ 340) をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列である配列 5' -TTTTGTCAATTGAGGAGT-3' (配列番号: 13) を有する。CP-18は、CryjIのアミノ酸 181 ~ 186 (Thr Ser Thr Glu Val Thr、配列番号 1 のアミノ酸 181 ~ 186) をコードするコード鎖配列に実質的に対応する非コード鎖配列である配列 5' -TACAACTCCAGTCGAAGT-3' (配列番号: 15) を有する (但し、CP-18 (配列番号: 15) の第4ヌクレオチドは、正しいヌクレオチドTではなくCとして合成された)。配列 5' -TAGCTCTCATTTGGTGC-3' (配列番号: 16) を有する CP-19は、CryjIのアミノ酸 270 ~ 275 (Ala Pro Asn Glu Ser Tyr) 配列番号 1 のアミノ酸 270 ~ 275) をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列である。CP-20は、CryjIのアミノ酸 251 ~ 256 (Tyr Ala Ile Glu Glu Ser、配列番号 1 のアミノ酸 251 ~ 256) に対するコード鎖である配列 5' -TATGCAATTGGTGGGAGT-3' (配列番号: 17) を有する。この配列決定したDNAは、図4a及び4bに示した配列 (配列番号: 1) を有することが見出された。これは、2つの重複するクローンJC71.6及びpUC19J91aからの複合配列である。CryjIの完全cDNA配列は、1312ヌクレオチドからなり、66ヌクレオチドの5' 非翻訳配列、1122ヌクレオチドの開

始メチオニンのコドンから始まるオープンリーディングフレーム及び3' 非翻訳領域を含む。ポリAテールの5' 側25ヌクレオチドの3' 非翻訳領域にはコン

センサスポリアデニル化シグナル配列が存在する（図4及び配列番号1のヌクレオチド1 2 7 9～1 2 8 3）。図4及び配列番号1のヌクレオチド1 3 1 3～1 3 3 7は、ベクター配列を表す。開始メチオニンの位置は、インフレームの上流終止コドンの存在及び開始メチオニン（植物に共通の配列AACAAUGGC Lutcke等（1987）EMBO J. 6: 43-48に匹敵するCryjI中に見出されたAAAAAUGGA（配列番号1の塩基6 2～7 0））を含む植物コンセンサス配列との78%の相同意により確実とされる。このオープソリーディングフレームは、374アミノ酸の蛋白質をコードしており、その最初の21アミノ酸は、成熟蛋白質からは開裂されるリーダー配列を含んでいる。この成熟蛋白質のアミノ末端は、公表されたN H₂末端配列（Taniai等（1988）、前出）及び精製したCryjI（実施例1）の直接アミノ酸分析により決定した配列との比較により同定された。成熟蛋白質の演繹されたアミノ酸配列（353アミノ酸からなる）は、公表されたCryjIの蛋白質配列（Taniai等、前出）と完全な配列同一性を有する（N H₂末端の最初の20アミノ酸及び16の隣接内部アミノ酸配列を含む）。この成熟蛋白質は又、コンセンサス配列N-X-S/Tに対応する5つの潜在的グリコシレーション部位を含む。

実施例4

日本で採取された杉花粉からのRNAの抽出

日本でCryptomeria japonica（杉）の木のプールから採取した新鮮な花粉を直ちにドライアイス上で凍結した。この花粉500mgから、本質的にFrankis及びMascarenhas Ann. Bot. 45: 595-599に記載されたようにしてRNAを調製した。試料をドライアイス上で乳鉢と乳棒ですり潰して、一晩0.1%DEPCで処理した0.2M NaCl、1mM EDTA、1% SDSを加えた5mlの50mMトリス（pH9.0）に懸濁させた。フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25:24:1で混合）で5回抽出した後に、RNAを、0.1容の3M酢酸ナトリウム及び2容のエタノールで水相から沈澱させた。ペレットを遠心分離で回収し、dH₂Oに再懸濁させて65℃に5分間加熱した。これらのRNA調製物に2mlの4M塩化リチウムを加えて、一晩9℃でインキュベートした。遠心分離によりRNAペレットを回収して、1mlのdH

H_2O に再懸濁させ、再び3M 酢酸ナトリウム及びエタノールで一晩沈殿させた。最終的ペレットを $100\mu\text{l}$ のd H_2O に再懸濁させて -80°C で保存した。

二本鎖cDNAを、 $8\mu\text{l}$ 花粉RNAから、cDNA合成システムキット(BRL)を用いてGubler及びHoffman(1983)Gene25:263-269の方法に従ってオリゴdT

Tプライミングで合成した。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を、dNTPを含む $10\mu\text{l}$ の $10\times$ 緩衝液を各 $100\text{p}\text{mol}$ のセンスオリゴヌクレオチド及びアンチセンスオリゴヌクレオチド($400\mu\text{l}$ の二本鎖cDNA反応混合物の $10\mu\text{l}$)、 $0.5\mu\text{l}$ のAmpliTaqDNAポリメラーゼ及び蒸留水($100\mu\text{l}$ にする)と混合して、GeneAmpDNA增幅キット(Perkin Elmer Cetus)を用いて行なった。

これらの試料を、MJ Research, Inc. (マサチューセッツ、Cambridge在)プログラム可能な温度制御装置を用いて増幅した。最初の5回の増幅は、 94°C で1分間の変性、 45°C で1分間のプライマーのテンプレートへのアニーリング及び 72°C で1分間の鎖延長からなった。最後の20回の増幅は、上記の通りの変性、 55°C で1分間のアニーリング及び上記の通りの鎖延長からなった。

この二本鎖cDNAを増幅するのに、次の7つの異なるCryJ1プライマー対を用いた：CP-9(配列番号：8)及びCP-17(配列番号：14)、CP-10(配列番号：9)及びCP-17(配列番号：14)、CP-10(配列番号：9)及びCP-16(配列番号：13)、CP-10(配列番号：9)及びCP-19(配列番号：16)、CP-10(配列番号：9)及びCP-18(配列番号：15)、CP-13(配列番号：10)及びCP-17(配列番号：14)、並びにCP-13(配列番号：10)及びCP-19(配列番号：

号：16)。CP-17(配列番号：14)は、配列5'-CCTGCAGAACGTTCAAC AACGTTAGA-3'を有し、アミノ酸SKRC*(配列番号1の350～353であり且つ終止コドン)をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列に対応する。ヌクレオチド配列5'-CCTGCAGAACGTT-3'(配列番号14の塩基1～13)は、クローニング目的のために加えられたPstI及びHindIII制限部

位を表す。スクレオチド配列 5' -TCA-3' (配列番号 14 の塩基 13 ~ 15) は、終止コドンの非コード鎖配列に対応している。すべての増幅は、エチジウムブロミド (EtBr) 染色したアガロースゲル上で見たところ、予想された寸法の生成物を生成した。これらのプライマー対の 2つを増幅において使用し、その生成物を全長配列決定のために pUC19 中にクローン化した。CP-10 (配列番号: 9) 及び CP-16 (配列番号: 13) を用いる二本鎖 cDNA における PCR 反応は、約 1.1 kb のバンドを生じ、JC130 とよばれた。別個の第 1 鎖 cDNA 反応を 8 μg の花粉 RNA を用いて上記のように行ない、オリゴスクレオチドプライマー-CP-10 (配列番号: 9) 及び CP-17 (配列番号: 14) を用いて増幅した。この増幅は、成熟蛋白質のアミノ末端から終止コドンまで、完全長の cDNA (JC135 という) を生成した。

増幅された DNA を、逐次的なクロロホルム、フェノール及びクロロホルム抽出と、その後の -20°C での

0.5 容の 7.5 酢酸アンモニウム及び 1.5 容のイソプロパノールでの沈澱により回収した。沈澱及び 70% エタノールでの洗浄の後に、DNA を、15 μl の反応にて、T4 ポリメラーゼで鈍端化してから EcoRI で消化し (JC130 の場合)、又は EcoRI と PstI で同時に消化し (JC135 の場合)、調製用 1% SeaPlaque 低融点ゲル (FMC) 中で電気泳動した。適当な寸法の DNA バンドを EtBr 染色により可視化し、取り出し、市販の配列決定用キット (オハイオ、Cleveland 在、U.S. Biochemicals) を用いるジデオキシチーンターミネーション法 (Sanger 等 (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5476) によるジデオキシ DNA 配列決定のために適当に消化した pUC19 中に繋いだ。

両鎖を、M13 順及び逆方向プライマー (マサチューセッツ、Beverly 在、N.E. Biolabs) 及び内部シーケンシングプライマー-CP-13 (配列番号: 10)、CP-15 (配列番号: 12)、CP-16 (配列番号: 13)、CP-18 (配列番号: 15)、CP-19 (配列番号: 16) 及び CP-20 (配列番号: 17) を用いて配列決定した。増幅 JC130 からの 2つのクローン (JC1

30a 及び J C 130b) 及び増幅 J C 135からの1つのクローン (J C 135g) は、配列から CryJI クローンであることが見出された。クローン J C 130a 及び J C 135g のヌクレオチド配列及び演繹されたアミノ酸配列は、以前から公知の CryJI 配列 (配列番号

: 1) と同一であった。クローン J C 130b は、1つのヌクレオチドが以前から公知の CryJI 配列 (配列番号 : 1) と違うことが見出された。クローン J C 130b は、配列番号 1 の 306 位のヌクレオチドに C を有した。このヌクレオチド変化は、成熟 CryJI 蛋白質のアミノ酸 60 の Tyr から His への予想されるアミノ酸変化を生じる。この多形は、未だ独立して誘導された PCRにおいて又は直接アミノ酸配列決定によって確認されていない。しかしながら、かかる一次ヌクレオチド及びアミノ酸配列における多形は予想されることである。

実施例 5

CryJI の発現

CryJI の発現を次のようにして行なった。10 μg の pUC19JC91a を XbaI で消化し、沈殿させ、次いで、T4 ポリメラーゼで鈍端化した。BamHI リンカー (マサチューセッツ、 Beverly 在、 N. E. Biolabs) を pUC19JC91a に一晩鈍端ライゲーションさせ、過剰のリンカーを NACS イオン交換ミニカラム (メリーランド、 Galt hersburg 在、 BRL) を通す濾過により除去した。次いで、リンカー結合した cDNA を、 EcoRI と BamHI で同時に消化した。CryJI 挿入物 (成熟蛋白質のアミノ末端をコードするヌクレオチドから終止コドンを通って伸びる) を、1% SeaPlaque 低融点アガロースゲル中でのこの消化物の電気泳動により単離した。次いで、この挿入物を適当に消化した、ユニークな EcoRI エンドヌクレアーゼ制限部位が後に続く ATG 開始コドンの直ぐ 3' 側に 6 ヒスチジン (His 6) をコードする配列を含むように改変した発現ベクター pET-11d (ウィスコンシン、 Madison 在、 Novagen; Jameel 等 (1990) J. Virol. 64: 3963-3966) 中にライゲーションした。ベクター中の第 2 の EcoRI エンドヌクレアーゼ制限部位は、 ClaI 及び HindIII エンドヌ

クレアーゼ制限部位と共に、以前に、EcoRI及びHindIIIでの消化、純端化及びリライゲーションによって除去した。このヒスチジン(His6)配列は、N_i²⁺キレー

ティングカラム(Hochuli等(1987)J. Chromatog. 411: 177-184; Hochuli等(1988)Bio/Tech. 6: 1321-1325)における組換え蛋白質(CryjI)のアフィニティー精製のために加えた。組換えクローンを用いて、T7ポリメラーゼをコードする遺伝子に先行するイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)誘導可能なプロモーターを有するプラスミッドを含有する大腸菌BL21-DE3株をトランスフォームした。IPTGでの誘導は、高レベルのT7ポリメラーゼ発現へと導き、これは、T7プロモーターを有するpET中の組換え蛋白質の発現に必要である。クローンpET-11dΔHRhis6JC91a.dは、CP-14(配列番号:11)を用いるジデオキシ配列決定(Sanger等、前出)により、発現のための正しいリーディングフレーム内のCryjIクローンであることが確認された。

組換え蛋白質の発現を、初期小規模培養(50ml)で確認した。クローンpET-11dΔHRhis6JC91a.dの一晩培養を用いて、アンピシリンを含む50mlの培地(Brain Heart Infusion Media, Difco)に接種し、A₆₀₀=1.0まで成育させ、次いで、IPTG(終濃度1mM)で2時間誘導した。この細菌の1mlのアリコートを誘導の前後で採取して、遠心分離によりペレット化し、そのペレットを50mMトリスHC1(pH6.8)2mM EDTA、1%SDS、β-メルカプトエタノール、10%グリセロ

ール、0.25%プロモフェノールブルー中で5分間煮沸することにより粗細胞溶解物を調製した(Studier等、(1990)Methods in Enzymology 185: 60-89)。組換え蛋白質発現を、Sambrook等、前出の方法に従って、予想される分子量約38kDaのクーマシーブルー染色したSDS-PAGEゲル上のバンドとして可視化した(ゲルには、40μlの粗溶解物を載せた)。陰性対照は、誘導してないCryjIのプラスミッドを含有する細菌からの粗溶解物及び誘導したプラス

ミッドを有しない細菌の溶解物からなった。

次いで、この p E T - 1 1 d Δ H R h i s 6 J C 9 1 a . d クローンを組換え蛋白質の発現及び精製のために成育させた。組換えプラスミッドを含む培養細菌 2 m l を 8 時間成育させ、次いで、固体培地（例えば、200 μg / m l のアンピシリンを含む LB 培地（メリーランド、Gaithersburg在、Gibco-BRL）中の 1 . 5 % アガロースを含む 6 個のペトリ皿（100 × 15 mm））上に線状にこすり付け、集密になるまで一晩成育させ、次いで、掻き取ってアンピシリン（200 μg / m l ）を含む 9 L の液体培地（Brain Heart Infusion 培地、Difco）に加えた。この培養を、A₆₀₀が 1 . 0 になるまで成育させ、I P T G を加え（終濃度 1 mM）、更に 2 時間成育させた。

細菌を遠心分離（7, 930 × g、10 分間）により回収して、90 m l の 6 M グアニジン-HC1、

0 . 1 M Na₂HPO₄ (pH 8 . 0) 中で激しく震盪しながら 1 時間溶解させた。不溶性物質を遠心分離（11, 000 × g、10 分間、4 °C）により除去した。溶解物の pH を 8 . 0 に調節し、6 M グアニジン HC1、100 mM Na₂HPO₄ (pH 8 . 0) で平衡化した 80 m l のニッケルNTAアガロースカラム (Qiagen) に加えた。そのカラムを、6 M グアニジン HC1、100 mM Na₂HPO₄、10 mM トリス-HC1 (pH 8 . 0) で、次いで、8 M 尿素、100 mM Na₂HPO₄ (pH 8 . 0) で、最後に 8 M 尿素、100 mM 酢酸ナトリウム、10 mM トリス-HC1 (pH 6 . 3) で、逐次的に洗った。カラムを、各緩衝液で、通過した流れの A₂₈₀が 0 . 05 以下になるまで洗った。

組換え蛋白質 CryjI は、8 M 尿素、100 mM 酢酸ナトリウム、10 mM トリス-HC1 (pH 4 . 5) で溶出され、10 m l のアリコートで採取した。各画分の蛋白質濃度を、A₂₈₀の吸収により測定して、ピーク画分をプールした。採取した組換え蛋白質のアリコートを、Sambrook 等、前出の方法に従って、SDS-PAGE で分析した。

最初の 9 L の調製物 (J C p E T - 1) は、クーマシーブルー染色した SDS

- PAGE ゲルの濃度測定 (Shimadzu Flying Spot Scanner, マサチユーセツ、 Braintree 在、 Shimadzu Scientific Instruments, Inc.) による

と純度約 78% の 30 mg の CryjI を生成した。同様にして調製した第 2 の 9 L 調製物 (J C p E T - 2) は、純度約 77% の 41 mg の CryjI を生成した。

実施例 6

CryjI (主要杉花粉アレルゲン) を用いた杉花粉アレルギー患者の T 細胞の研究 重複するペプチドの合成

杉花粉 CryjI の重複するペプチドを、標準的 F m o c / t B o c 合成化学を用いて合成し、逆相 H P L C により精製した。図 13 は、これらの研究で用いた CryjI ペプチドを示す。ペプチドの名称は、一貫している。

杉花粉抗原ペプチドに対する T 細胞応答

末梢血液単核細胞 (P B M C) を、季節性鼻炎の臨床症状を示し且つ杉花粉に対する M A S T 及び / 又は皮膚試験陽性の杉花粉アレルギー患者からの 60 ml のヘパリン化した血液のリンパ球分離培地 (L S M) 遠心分離によって精製した。長期 T 細胞系統を、完全培地 (熱で不活性化した 5% ヒト A B 血清を補った R P M I - 1 6 4 0 、 2 mM L - グルタミン、 1 0 0 U / m l ベニシリン / ストレプトマイシン、 5×10^{-5} M 2 - メルカブトエタノール及び 10 mM H E P E S) のバルク培養における 2×10^6 P B L / m l の、保湿した 5% C O₂ インキュベーター内での、 20 μ g / m l の部

分精製した天然 CryjI (75% の純度で、図 2 の 3 本のバンドと類似した 3 本のバンドを含む) での 37°C で 7 日間の刺激によって樹立し、 CryjI 反応性 T 細胞を選択した。この量のプライミング抗原は、殆どの杉花粉アレルギー患者からの T 細胞の活性化に最適であることが測定された。生存細胞を L S M 遠心分離により精製し、 5 単位 / m l の組換えヒト I L - 2 及び 5 単位 / m l の組換えヒト I L - 4 を補った完全培地内で、細胞がもはやリンホカインに応答せず且つ「休止した」と考えられるまで最長で 3 週間培養した。次いで、 T 細胞の、選択したペプチド、組換え CryjI (rCryjI) 、精製した天然 CryjI 又は組換え Amb a I . 1

(rAmb a I. 1) に対して増殖する能力を評価した。アッセイのために、 2×10^4 の休止細胞を、 2×10^4 のエプスタイーバールウイルス (EBV) トランスフォームした自家B細胞（後述のようにして調製した）(25,000 RADでガンマー照射したもの) の存在下で、丸底96ウェルプレートの2若しくは3ウェル中の $200 \mu\text{l}$ の容積の完全培地の中で、 $2 \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のrCryjI、精製した天然CryjI又はAmb a I. 1で2~4日間再刺激した。次いで、各ウェルに、 $1 \mu\text{Ci}$ のトリチウム化チミジンを $16 \sim 20$ 時間加えた。取り込まれたカウントをガラス纖維フィルターマット上に集め、液体シンチレーション計数処理した。図12は、組換えCryjI、精製した天然CryjI及び組換えAmb a I. 1並びに上記のようにし

て合成した幾つかの抗原性ペプチドを用いるアッセイにおいて抗原量を変えることの効果を示している。幾つかのペプチドは、これらのアッセイにおいて、高濃度では阻害的であることが見出された。滴定を用いて、これらのペプチドのT細胞アッセイにおける投与量を最適化した。各ペプチドの滴定における最大応答を、刺激インデックス (S. I.) として表す。このS. I. は、ペプチドへの応答において細胞により取り込まれたカウント/分 (CPM) を、培地のみの中での細胞により取り込まれた CPM で除したものである。バックグラウンドの2倍以上の S. I. 値は、「陽性」と考えられ、そのペプチドが T 細胞エピトープを含むことを示す。これらの陽性結果は、試験した患者の群の各ペプチドの平均刺激インデックスの計算において使用した。図12に示したこれらの結果は、999番の患者が、組換えCryjI及び精製した天然CryjI並びにペプチドCJ1-2、3、20及び22に対してよく応答するが組換えAmb a I. 1には応答しないことを示している。これは、CryjIT細胞エピトープがこの特定のアレルギー患者からのT細胞により認識されること、並びにrCryjI並びにペプチドCJ1-2、3、20及び22がかかるT細胞エピトープを含むことを示す。更に、これらのエピトープは、しばしば、隣接する重複するペプチドで検出されず、従って、恐らく、反応性ペプチドの重複しない中央の残基に及ぶ。対照抗原でプライムされたT細胞又は他の抗原に対

してCryjIプライムされたT細胞を用いるT細胞アッセイにおいて、有意の交差反応性は見出されなかった。

上記の手順を、他の数人の患者についても行なった。個々の患者の結果を、もし、その患者がCryjI蛋白質に2.0以上のS.I.で応答し且つCryjIから導かれた少なくとも1つのペプチドに2.0以上のS.I.で応答したならば、各ペプチドについての平均S.I.の計算に用いた。25人の患者からの陽性の実験の概要を図14に示す。棒は、ポジティビティーアインデックスを表している。各棒の上にあるのは、試験した患者群におけるペプチド若しくは蛋白質に対する少なくとも2のS.I.を有する陽性応答のパーセントである。各棒の上の括弧内にあるのは、試験した患者群についての各ペプチド若しくは蛋白質に対する平均刺激インデックスである。すべての25人のT細胞系統は精製した天然CryjIに応答し、これらのT細胞系統の68.0%は、rAmb a I. 1にも応答し、これは、Amb a I. 1アレルゲンがCryjIとある程度の相同意を共有していること及び「共有される」T細胞エピトープがcryjIとAmb a I. 1との間に存在するであろうことを示している。この杉アレルギー患者のパネルは、ペプチドCJ1-1、CJ1-2、CJ1-3、CJ1-4、CJ1-7、CJ1-8、CJ1-9、CJ1-10) CJ1-11、CJ1-12、CJ1-14、CJ1-15、CJ1-16、CJ1-17、CJ1-18、CJ1-19、CJ1-20、CJ1-21、CJ1-22、CJ1-23、CJ1-24、CJ1-25、CJ1-26、CJ1-27、CJ1-28、CJ1-30、CJ1-31、CJ1-32、CJ1-33、CJ1-34及びCJ1-35に応答し、これは、これらのペプチドがT細胞エピトープを含むことを示している。

抗原提示細胞としての利用のための(EBV)トランスフォームしたB細胞の調製

自家EBVトランスフォームした細胞系統を、25,000ラドでガンマー照射して、第2増殖アッセイ及び第2バルク刺激において抗原提示細胞として用いた。これらの細胞系統を、免疫蛍光フローサイトメトリー分析においても対照と

して用いた。これらのE B Vトランスフォームした細胞系統を、 5×10^6 P B Lを1 mlのB-59/8マーモセット細胞系統（ATCC CRL1612、メリーランド、Rockville在、American Type Culture Collection）調整培地と共に、 $1 \mu g / ml$ のフォルボール12-ミリステート13-アセテート（PMA）の存在下で、37°Cで60分間、 12×75 mmポリエチレン製丸底Falconスナップキャップチューブ（ニュージャージー、Lincoln Park在、Becton Dickinson Labware）中でインキュベートすることにより作成した。これらの細胞を、次いで、前述のようにRPMI-

1640にて 1.25×10^6 細胞/mlに希釈した（但し、熱で不活性化したウシ胎児血清10%を補い、 $200 \mu l$ のアリコートを平底培養プレートにて肉眼でコロニーが検出されるまで培養した）。次いで、それらを、細胞系統が樹立されるまで、より大きいウェルに移した。

実施例7

主要杉花粉アレルゲンとしてのCryjI

杉花粉の主要アレルゲンとして報告されたcryjIの重要性を試験するために、直接及び競争ELISAの両アッセイを行なった。ウェルを杉花粉の可溶性花粉抽出物（SPE）又はCryjI（蛋白質配列決定により純度90%で検定）で被覆し、これらの抗原に対するヒトIgE抗体結合を分析した。杉花粉MASTで2.5以上の評点を有する15人の患者からの等量の血漿からなるプールしたヒト血漿及び2人の個々の患者の血漿試料をこのアッセイにおいて比較した。図5は、これらの2種の抗原との結合反応性の結果を示している。結合の全体のパターンは、被覆抗原がSPEであっても（図5a）又は精製された天然cryjIであっても（図5b）非常に類似している。

競争アッセイにおいては、ELISAのウェルを杉花粉SPEで被覆し、次いで、アレルギー患者のIgE結合を、溶液中で競争する精製された天然CryjIの存在下

で測定した。これらのアッセイにおけるアレルギー性IgEの源は、15人の患

者からの血漿のプール（P H Pで示す）又は杉花粉M A S Tで2.5以上の評点を有する患者からの7つの個々の血漿試料であった。このプールしたヒト血漿試料を用いる競争アッセイは、杉花粉S P E及び無関係のアレルゲン源であるライグラスS P Eに対する精製した天然CryjIの競争結合能力を比較する。図6は、プールしたヒト血漿を用いた競争E L I S Aのグラフ化した結果を示す。杉花粉S P E中に存在する蛋白質の濃度は、各競争点において、精製した天然CryjIより約170倍大きい。この分析から、精製した天然CryjIが、I g E結合に関して、杉花粉可溶性花粉抽出物中に存在するすべての範囲の蛋白質と非常によく競争することは明らかである。これは、抗CryjI Ig E反応性の殆どが天然CryjIに對して向けられていることを意味する。陰性対照は、溶液中の特異的な競争活性及び競争S P Eが被覆されたウェルへの結合を完全に除去することは出来ないということを示す。このアッセイを、アレルギー集団内のIg E応答の範囲の尺度として、個々の患者について繰り返した。図7は、このS P Eへの結合の競争が精製した天然CryjIで行なわれたという結果を示している。これらの結果は、これらの患者が杉花粉S P Eに対する異なる投与量応答を示すにもかかわらず、7人の患者の杉花粉S P Eに対するIg E結合の各々は、精製した天然cryjIに匹敵し得るということを示す。これらデータの含意することは、各患者について、CryjIに對して向けられたIg E反応性が優勢であるが、この反応性には患者間で変化があるということである。全体的結論は、これらのデータが、CryjIが杉花粉の主要アレルゲンであるという以前の発見（Yasueda等、（1988）、前出）を支持するということである。

杉花粉アレルギー患者からのIg Eのその花粉蛋白質に対する反応性は、これらの蛋白質を変性したときに、劇的に減少する。この性質を分析する1つの方法は、被覆抗原が杉花粉S P E又は還元剤D T Tの存在下で煮沸することにより変性した変性した杉花粉S P Eである直接結合E L I S Aによるものである。次いで、これをアレルギー患者の血漿を用いて、Ig E結合反応性について試験する。図8aは、このS P Eに対する、7人の個々の血漿試料を用いる直接結合アッ

セイを示す。図8 bでは、変性したSPEを用いた結合結果は、この処理の後で、反応が顕著に減少したことを示している。ELISAウェルへのCryjI結合の程度を調べるために、CryjIを、Amb a I及びII蛋白質ファミリーに対するウサギポリクローナル抗血清で検出した。これらのブタクサ蛋白質は、CryjIと高度の配列同一性(46%)を有しており、この抗血清を交差反応性抗体検出システムとして用いることが出来る。結論として、これらのデータは、杉花粉SPEの変性後の顕著なIgE反応性の喪失

を示している。

実施例8

IgE反応性及びヒスタミン放出分析

細菌内で発現させ、次いで(実施例5に記載した様にして)精製した組換えCryjI蛋白質(rCryjI)を、IgE反応性について試験した。この試験に適用した最初の方法は、ウェルを組換えCryjIで被覆して個々の患者についてIgE結合をアッセイした、直接ELISAであった。このデータセットにおける唯一の陽性シグナルは、従来法で調製した2つの対照用抗血清ウサギポリクローナル抗Amb a I及びII(ウサギ抗Amb a I及びII)及びCryjIと交差反応するAmb a Iに対して高められたモノクローナル抗体CBF2からのものである。この方法により、試験したすべての患者は、組換えCryjIとのIgE反応性を示さなかつた。

組換えCryjIに対するIgE反応性の試験に適用された他の分析方法は、捕獲ELISAであった。この分析は、抗原に結合し及び他のエピトープ部位への抗体の結合を与える限定された抗体(ここでは、CBF2)の利用に依存している。この捕獲ELISAの形式は、1) MAb CBF2でウェルを被覆し、2) 抗原又はPBS(一種の陰性対照として)を加えて、被覆したMAbとの特異的相互作用により捕獲させ、3) 対照用抗体抗Amb a I及びII(図10 b)又はヒトアレルギー性血漿(図10 a)の何れかを検出抗体として加え、そして4) 抗体結合の検出をア

ッセイするというものである。IgE分析のために、プールしたヒト血漿（P H P）（15患者）を用いた。これらの結果からの結論は、この分析方法によつては、ヒトアレルギー性IgEのrCryjIに対する特異的結合は示されないということである。しかしながら、rCryjIの捕獲は、図10bに示した対照抗体結合曲線により証明されたように働く。大腸菌で発現されたrCryjIに対するIgE結合の欠如は、炭水化物又は他の何れかの翻訳後修飾の不在及び／又はIgEの大多数が変性したCryjIと反応しえないためであろう。RAST、競争ELISA及びウエスタンブロッティングのデータも又、rCryjIに対する特異的IgE結合を示さない（データは示さない）。

ヒスタミン放出アッセイを、杉花粉アレルギー患者について、杉花粉SPE、精製した天然CryjI及びrCryjIを追加抗原として用いて行なった。このアッセイは、ヒト好塩基球メディエーター放出によるIgE反応性の測定である。図11に示したこのアッセイの結果は、広範囲の濃度にわたる精製した天然CryjI及び杉花粉SPEによる強いヒスタミン放出を示している。CryjIによる何らかの測定可能なヒスタミン放出がある唯一の点は、最大濃度 $50\mu g/ml$ においてである。このrCryjIによる放出の2つの可能な説明は、1) CryjIの組換え型を認識し得る抗CryjI IgEの非常に低い割合との特異

的な反応、又は2) 最大抗原濃度でのみ認められた細菌夾雜物の低濃度により引き起こされた非特異的放出である。今までのところ、この結果は、一人の患者において示されただけである。更に、この示されたデータは、各蛋白質濃度における1つのデータ点からのものである。

大腸菌で発現させた物質はT細胞反応性を有する（実施例6）が、Cryptomeria japonicaアトペス(atopes)からのIgEに結合しないようであり、かかるアトペスのマスト細胞及び好塩基球からのイン・ビトロでのヒスタミン放出も引き起こさないので、この組換えにより発現されたCryjI蛋白質を免疫療法に用いることは可能であろう。IgEに結合し得るrCryjIの発現は、恐らく、酵母、昆虫（バキュロウイルス）又は哺乳動物細胞（例えば、CHO、ヒト及びマウス）中で達成出来るであろう。哺乳動物細胞での発現の特定の例は、組換えCryjIをC

O S 細胞中で発現する p c D N A I / A m p 哺乳動物発現ベクター（カリフォルニア、 San Diego在、 Invitrogen）の利用であつてよい。活性に I g E に結合し得る rCryjI は、診断目的のための組換え物質の利用のために重要であり得る。

選択した CryjI ペプチドに対する I g E 反応性を分析するために、直接 E L I S A 形式を用いた。 E L I S A 用のウェルを、 CryjI から誘導した 25 ペプチドで被覆して I g E 結合についてアッセイした。図 15 a 及び 15 b は、 P H P (15 患者) を杉花粉アレルギー性

I g E 源として用いた、これらの結合結果のグラフである。この血漿のプールを、変性した S P E (直接 E L I S A で測定したとき) に結合することが出来、それ故、これらのペプチドに対する反応性の機会を増大させることが出来るであろう I g E の富化のために配合した。このアッセイにおいて、ペプチド I g E 結合能力を、精製した天然 CryjI 及び rCryjI のそれと比較した。このアッセイで検出された唯一の特異的 I g E は、精製した天然 CryjI に対するものであり、これは、杉アレルギー患者の I g E は組換え CryjI 又は試験した組換え CryjI ペプチドと結合しないという発見を支持している (図 15)。

この発明をその好適な具体例を参照して説明したが、他の具体例も同じ結果に到達することが出来る。本発明の変化及び改変は、当業者には自明であろうが、かかる改変及び等価物並びにこの発明の精神に従うものすべては、請求の範囲において保護されるべきものである。

実施例 9

Juniperus sabinaoides, Juniperus virginiana 及び Cupressus arizonica 花粉から
の R N A の抽出並びに、 CryjI の相同物 JunsI 及び JunvI のクローニング

新鮮な花粉を、 Arnold Arboretum (マサチューセッツ、 Boston) の一本の Juniperus virginiana の木から採取して直ちにドライアイス上で凍結した。 Juniperus

sabinoides 及び Cupressus arizonica の花粉を Greer Laboratories, Inc. (ノースカロライナ、 Lenoir) から購入した。全 R N A を、 J. virginiana, J. sabinoides

*iides*及び*C. arizonica*の花粉から実施例3に記載したようにして調製した。一本鎖cDNAを、5μgの*J. virginiana*からの全花粉RNA及び5μgの*J. sabinoides*からの全花粉RNAから、cDNA合成システムキット（メリーランド、Gaithersburg在、BRL）を用いて、実施例3に記載したようにして合成した。

2つの柏種からのCryjI相同物をクローニングする最初の試みを、両柏cDNAにおけるPCR増幅においてCryjI特異的なオリゴヌクレオチドの種々の対を用いて行なった。PCRを、実施例3に記載したようにして行なった。使用したオリゴヌクレオチドプライマー対は、CP-9/CP-17、CP10/CP-17、CP-10/CP-16、CP-10/CP-19、CP-10/CP-18、CP-13/CP-17、及びCP-13/CP-19であった。Gross等(1978) Scand. J. Immunol. 8: 437-441により、*J. sabinoides*の最初の5アミノ酸はCryjIのそれらと同一であると報告されているので、大多数の反応において、CP-10を5'プライマーとして用いた。これらのオリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドプライマー対は、実施例3に記載してある。

上記のプライマー対の何れも、EtBr染色した1%

アガロース（メイン、Rockland在、FMC Bioproducts）ミニゲル上で見たときに、何れの柏種に対するPCR生成物をも生じなかった。

*J. sabinoides*及び*J. virginiana*からCryjI相同物をクローン化することを意図したPCR増幅の次のシリーズを、各種からのRNAから合成した二本鎖のリンクー結合されたcDNAについて行なった。二本鎖cDNAを、各5μgの*J. virginiana*及び*J. sabinoides*の花粉RNAから実施例3に記載したようにして合成した。この二本鎖cDNAを、実施例3に記載した改変アンカードPCRにおいて用いるために、エタノール沈殿して自己アニールしたAT及びALオリゴヌクレオチドに対してライゲーションした。次いで、幾つかのCryjIプライマーを、CryjI相同物をこれらの2柏種から単離する試みにおいて、APと組合せて用いた。AT、AL及びAPの配列は、実施例3で与えてある。最初に、第1のPCRを、100pモルの各オリゴヌクレオチドCP-10及びAPを用いて行なった。次いで、この初期増殖の3パーセント(3μl)を、それぞれ10

0 p モルの C P - 1 0 及び A P A を用いる第 2 の P C R において用いた (A P T は、配列 5' -GGGCTCGAGCTGCAGTTTTTTTTTTTG-3' を有し、ここに、ヌクレオチド 1 ~ 1 5 は、クローニング目的のために追加された P s t I 及び X h o I エンドヌクレアーゼ制限部位を表し、ヌクレオチド 3 3 は A 又は C であってもよい)。第 2 の P C R 反

応の試験においては、E t B r 染色したアガロースゲル上に、分離したバンドを有しないブロードなスメアが現れた。CryjI相同物をこれらの P C R 生成物からクローニングする試みは、成功しなかった。このアプローチは、これらの遺伝子のカルボキシル部分をクローニングしたであろう。次いで、実施例 3 で記載した縮退した CryjI プライマー C P - 1 、 C P - 4 及び C P - 7 をそれぞれ、二本鎖のリンカー結合した J. virginiana 及び J. sabinoides c D N A についての第 1 の P C R において A P と共に用いた。次の様な種々のプライマー対の組合せを第 2 の P C R において用いた： C P - 2 / A P 及び C P - 4 / A P (C P - 1 / A P の第 1 P C R 増幅混合物に) 、 C P - 2 / A P 及び C P - 5 / A P (C P - 4 / A P の第 1 P C R 増幅混合物に) 、及び C P - 8 / A P (C P - 7 / A P 第 1 P C R 増幅混合物に) 。最後の増幅 (C P - 8 / A P の第 2 P C R 増幅) のみが、試験において、E t B r 染色したミニゲル上にバンドを生じた。その他は、p U C 1 9 中にクローン化し得ないスメアを与えた。実施例 3 に記載した C P - 8 及び A P を用いた J. virginiana 及び J. sabinoides の第 2 P C R の両者 (J V 2 1 及び J S 1 7 という) は、それぞれ、約 2 0 0 塩基対長の増幅された生成物を生じた。この増幅された D N A を、実施例 3 に記載したようにして回収して、 5 0 μ l 反応中で X b a I 及び P s t I で同時に消化し、沈殿させて容積を 1 0 μ l まで減少させ、調製用

2 % G T G NuSeive 低融点ゲル (メイン、Rockport 在、FMC) 中で電気泳動した。適当な寸法の D N A バンドを E t B r 染色により可視化し、取り出して、市販の配列決定用キット (Sequenase kit, オハイオ、Cleveland 在、U. S. Biochemicals) を用いる Sanger 等 (前出) のジデオキシチエントミネーション法によ

る配列決定のために適当に消化した pUC19 中にライゲーションした。2つの JS17 クローン (pUC19 JS17d 及び pUC19 JS17f) 及び1つの JV21 クローン (pUC19 JV21g) を配列決定して CryjI ヌクレオチドに相同な配列を含むことを見出し且つアミノ酸配列を演録した。この J. sabinoides 及び J. virginiana DNA から単離した CryjI 相同物をそれぞれ、 Junsi 及び Junvi と呼んだ。

CryjI プライマー CP-9 及び CP-10 は、第1及び第2PCRにおいて、それぞれ、 APと共に働いて、 Junsi 及び Junvi cDNA のカルボキシ部分を増幅させる。これらのプライマーの配列は、 CP-9 中の 2ヌクレオチド (CP-9 の 5位の A の代りの T、 12位の A の代りの C) と CP-10 中の 1ヌクレオチド (Junsi については 12位の A の代りの Cのみ) を除いては、本質的に、 Junsi I 及び Junvi の配列と同じである。しかしながら、 CP-9 及び AP を用いる第1PCR 及び CP-10 及び AP を用いる第2PCR は、 EtBr 染色したアガロースゲル上で見たときに、同定可能な Junsi

I 生成物も Junvi 生成物も生じなかった。

オリゴヌクレオチド J1 を合成した。J1 及びすべての後のオリゴヌクレオチドを、 ABI394 DNA/RNA シンセサイザー (カリフォルニア、 Foster City 在、 Applied Biosystems) にて合成した。第1PC を、 J. virginiana 及び J. sabinoides cDNA と共に AP 及び J1 を用いて行なった。J1 は、 Junsi (図 16) のヌクレオチド 20~37 及び Junvi (図 17) のヌクレオチド 30~47 に対応する配列 5' -CTAAAAATGGCTTCCCCA-3' を有する。第2PCR 増幅を、 J. sabinoides cDNA の第1の J1 / AP 増幅に対して、 プライマー J2 及び AP を用いて行なった。J2 は、 配列 5' -CGGGAATTCTAGATGTGCAATTGTATCTTGTAA-3' を有し、 ここに、 ヌクレオチド 1~13 は、 クローニング目的のために加えられた EcoRI 及び XbaI エンドヌクレアーゼ制限部位を表し、 残りのヌクレオチドは、 Junsi 配列 (図 16) 中のヌクレオチド 65~84 に対応する。J. virginiana cDNA からの第2の増殖を、 AP 及び J3 を用いて行なった (J3 は、 配列 5' -CGGGAATTCTAGATGTGCAAATAGTATCTTGTG-3' を有し、 ここに、 ヌクレオチド

1～13は、クローニング目的のために加えられたEcoRI及びXbaIエンドヌクレアーゼ制限部位を表し、残りのヌクレオチドは、JunvI配列（図17）中のヌクレオチド75～94に対応する）。何れの第2の反応においても、特異的な増幅生成物は認められなかった。ED及びEDTと呼ばれる

プライマーを、下記のように、モル比3：1（ED：EDT）で、プライマーJ1、J2及びJ3と共に用いた。EDTは、配列5'-GGAATTCTCTAGACTGCAGGTTTTTTTTTTTTT-3'を有する。EDTのヌクレオチド1～20をポリTトラックに加えて、クローニング目的のためのEcoRI、XbaI及びPstIエンドヌクレアーゼ制限部位を造った。EDは、EDTのヌクレオチド1～21に対応する配列5'-GGAATTCTCTAGACTGCAGGT-3'を有する。これらのオリゴヌクレオチド及びそれらの利用は、以前に記載された（Morgenstern等（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA88: 9690-9694）。ED/EDTを、第1PCRにおいて、J. sabinoides及びJ. virginiana cDNAからの増幅のために、オリゴヌクレオチドJ1と共に用い、それから、第2PCRを、オリゴヌクレオチドJ2及びAPA（J. sabinoides用）又はJ3及びAPA（J. virginiana用）を用いて行なった。これらの増幅からは、特異的な生成物は同定されなかった。J1、J2及びJ3を用いる最後のPCRセットを、オリゴヌクレオチドAPAを用いて試みた。APAを、第1PCR反応において、J. sabinoides及びJ. virginiana用のJ1と共に用い、それから、第2の増幅をJ2（J. sabinoides用）又はJ3（J. virginiana用）とAPAとを用いて行なった。これらの増幅からは、特異的な生成物は同定されなかった。次いで、縮退したプライマーCP-57を合成した。CP-57は、配列5'-GGCCT

GCAGTTAACAGCGTTGCAGAAGGTGCA-3'を有し、ここに、10位のTはCでもよく、11位のTはCでもよく、13位のAはGでもよく、16位のGはA、T若しくはCでもよく、18位のGはTでもよく、19位のTはCでもよく、22位のGはA、T若しくはCでもよく、23位のCはGでもよく、24位のAはCでもよく、25位のGはA、T若しくはCでもよく、27位のAはGでもよく、28位

のGはA、T若しくはCでもよく、29位のGはCでもよく、30位のTはAでもよく、そして、31位のGはAでもよい。CP-57のヌクレオチド1~9を、クローニング目的のために加えてPstI部位を造ったが、ヌクレオチド10~12は終止コドンに相補的であり、ヌクレオチド13~33は、本質的にアミノ酸CysSerLeuSerLysArgCys（図4bのアミノ酸347~353；図4bのヌクレオチド1167~1187に対応する）をコードするコード鎖配列に相補的である。これを、第1PCRにおいて、J1と共に、J. sabinoides及びJ. virginianaの二本鎖のリンカー結合されたcDNAに対して用い、それから、第2PCRを、J. sabinoidesについてはCP-57及びJ2を、J. virginianaについてはCP-57及びJ3を用いて行なった。3つの追加の縮退したCryjIオリゴヌクレオチドを合成した。CP-62は、配列5' CCACTAAATA TTATCCA-3' を有し、ここに、3位のAはGでもよく、6位のAはGでもよく、9位のTはA若し

くはGでもよく、12位のTはA若しくはGでもよい。この縮退したオリゴヌクレオチド配列は、本質的にアミノ酸TrpIleIlePheSerGly（図4aのアミノ酸69~74；図4aのヌクレオチド333~349に対応する）をコードするコード鎖配列に相補的である。CP-63は、配列5' -GCATCCCCATTGGGGATG-3' を有し、ここに、3位のAはGでもよく、9位のAはGでもよく、12位のTはCでもよく、15位のGはA、T若しくはCでもよく、18位のAはGでもよい。この縮退したオリゴヌクレオチド配列は、アミノ酸HisProGlnAspGlyAspAla（図4aのアミノ酸146~152；図4aのヌクレオチド564~583に対応する）をコードし得る配列に相補的である。CP-64は、配列5' -GTCCATGGATCATAATTATT-3' 有し、ここに、6位のTはCでもよく、9位のAはGでもよく、12位のAはGでもよく、15位のAはGでもよく、18位のAはGでもよい。この縮退したオリゴヌクレオチド配列は、アミノ酸AsnAsnTyrAspProTrpThr（図4bのアミノ酸243~249；図4bのヌクレオチド855~874に対応する）をコードし得るコード鎖配列に相補的である。APを、第1PCR增幅において、CP-62、

C P - 6 3 、 C P - 6 4 及び C P - 3 (実施例 3 に記載) と共に、 J. sabinoides 及び J. virginiana の二本鎖のリンカー結合した両 c D N A に対して用いた。診断用 P C R を、 各第 1

反応混合物について行なった。この診断用 P C R において、 第 1 反応の 3 % を、 上記のように A P 及び C P - 8 を用いて増幅した。 J. sabinoides 及び J. virginiana の両者に対して、 約 200 塩基対の予想されるバンドが、 A P 及び C P - 6 3 を用いる第 1 P C R からの診断用 P C R において認められた。

次いで、 縮退したプライマー C P - 6 5 を合成した。 C P - 6 5 は、 配列 5' - G C C T G C A G T C C C C A T C T T G G G G A T G G A C - 3' を有し、 ここに、 15 位の A は G でもよく、 18 位の T は C でもよく、 21 位の G は G 、 A 、 T 若しくは C でもよく、 24 位の A は G でもよく、 27 位の G は A 、 T 若しくは C でもよい。 C P - 6 5 のヌクレオチド 1 ~ 9 を、 クローニング目的のために加えて P s t I 制限部位を造ったが、 残りの縮退したオリゴヌクレオチド配列は、 本質的にアミノ酸 V a l H i s P r o G l n A s p G l y A s p (図 4 a のアミノ酸 145 ~ 151 ; 図 4 a のヌクレオチド 561 ~ 580 に対応する) をコードし得るコード鎖配列に相補的である。 A P を、 上記の J. sabinoides 及び J. virginiana の第 1 の A P / C P - 6 3 増幅の第 2 P C R において、 C P - 6 5 と共に用いた。これらの反応物を、 J S 4 2 (J. sabinoides) 及び J V 4 6 (J. virginiana) と呼んだ。 第 2 P C R は、 両者とも、 1 % アガロースミニゲル上で E t B r 染色して調べたときに、 約 600 塩基対のバンドを与えた。 J S 4 2 及び J V 4 6 P C R からの D N A を実施例 3 に記載した

ようにして回収し、 15 μl の反応中で X b a I 及び P s t I で同時に消化し、 次いで、 調製用 2 % G T G SeaPlaque 低融点ゲル (メイン、 Rockport 在、 FMC) 中で電気泳動した。 適当な寸法の D N A バンドを、 E t B r 染色で可視化し、 取り出して、 市販の配列決定用キット (Sequenase kit, オハイオ、 Cleveland 在、 U . S . Biochemicals) を用いるジデオキシチーンターミネーション法 (Sanger 等、 前出) による配列決定のために、 適当に消化した p U C 1 9 中にライゲーシ

ヨンした。クローンを、M 1 3用の順及び逆方向プライマー（マサチューセッツ、Beverly在、N. E. Biolabs）及び内部シーケンシングプライマーJ 4を用いて配列決定した。JunsI及びJunvIの両者について、J 4は、配列5' -GCTCCACCATGG GAGGCA-3'（図16のヌクレオチド177～194及び図17のヌクレオチド187～204）を有し、それは、本質的にアミノ酸Ser Ser Thr Met Gly G1y（図16及び17にそれぞれ示すJunsI及びJunvIのアミノ酸30～35）をコードするコード鎖配列である。

このJunsIクローンの配列（pUC19JS42eと呼ぶ）は、5' 非翻訳領域において異なる長さを有しているにもかかわらず、クローンpUC19JS17d及びpUC19JS17fの配列と、それらの重複領域において同一であることが見出された。クローンpUC19JS17dは、最長の5' 非翻訳配列を有した。図

16のヌクレオチド1～141は、クローンpUC19JS17dの配列に対応する。クローンpUC19JS42eは、図16のヌクレオチド1～538に対応する。

pUC19JV46及びpUC19JV46bと呼ばれるJunvIクローンの配列は、クローンpUC19JV21gの配列と、それらの重複領域において同一であった（但し、図17のヌクレオチド83は、示されているTではなく、クローンpUC19JV21g中ではAであった）。このヌクレオチドの差異は、予想されるアミノ酸変化を生じない。クローンpUC19JV46a、pUC19JV46b及びpUC19JV21gは、それぞれ、図17のヌクレオチド1～548、1～548及び2～151に対応する。

これらのJunsI及びJunvI遺伝子の残りをコードするcDNAを、それぞれのリンクマー結合されたcDNAから、縮退したオリゴヌクレオチドCP-66（CP-66は、配列5' -CATCCGCAAGATGGGGATGC-3'を有し、ここに、3位のTはCでもよく、6位のGはA、T若しくはCでもよく、9位のAはGでもよく、12位のTはCでもよく、18位のTはCでもよい）及びAPを第I PCRで用いてクローン化した。CP-66の配列は、CP-63のそれと相補的である。第2P

C R を、最初の増幅混合物の 3 %について、各 1 0 0 p モルの A P 及び C P - 6 7 を用いて行なった。C P - 6 7 は、配列 5' - C

GGGAATTCCCTCAAGATGGGGATGCGCT-3' を有し、ここに、15位の A は G でもよく、18位の T は C でもよく、24位の T は C でもよく、27位の G は A、T 若しくは C でもよく、28位の C は T でもよい。プライマー C P - 6 7 のヌクレオチド配列 5' - CGGGAAATTTC-3' (塩基 1 ~ 9) を、クローニング目的のために加えて E c o R I 制限部位を造った。残りのオリゴヌクレオチド配列は、本質的に、アミノ酸 Pro Glu Asp Gly Ala Leu (図 4 a のアミノ酸 147 ~ 153; 図 4 a のヌクレオチド 567 ~ 586 に対応する) をコードする。これらの、*J. sabinoides* 増幅からの D N A 生成物 (J S 4 5 と呼ぶ) 及び *J. virginiana* 増幅からの D N A 生成物 (J V 4 9 i i と呼ぶ) を、実施例 3 に記載したようにして精製し、E c o R I 及び X b a I (J S 4 5) 又は E c o R I 及び A s p 7 1 8 I (J V 4 9 i i) で消化し、調製用 1 % 低融点ゲル中で電気泳動した。約 6 5 0 b p 長の主な D N A バンドを取り出して、配列決定のために p U C 1 9 中にライゲーションした。D N A を、市販のキット (sequenase kit, オハイオ、Cle veland 在、U. S. Biochemicals) を用いて、ジデオキシチエントーミネーション法 (Sanger 等、前出) により配列決定した。

Jun s I 及び Jun v I についての p U C 1 9 J S 4 5 a 及び p U C 1 9 J V 4 9 i i a と呼ばれる 2 つのクローンを、それぞれ、M 1 3 用の順及び逆方向プライマー (マサチューセッツ、Beverly 在、N. E. BioLabs) 及び内部シーケン

シングプライマー J 8、J 9 及び J 1 2 (Jun s I 用) 及び J 6 及び J 1 1 (Jun v I 用) を用いて配列決定した。J 8 は、配列 5' - TAGGACATGATGATACAT-3' (図 1 6 のヌクレオチド 690 ~ 707) を有し、これは、本質的に Jun s I のアミノ酸 L e u G l y H i s A s p A s p T h r (図 1 6 のアミノ酸 201 ~ 206) をコードするコード鎖配列である。J 9 は、配列 5' - GAGATCTACACCGAGATGC-3' (図 1 6 のヌクレオチド 976 から 993) を有し、これは、本質的に Jun v I のアミノ酸 A r g S e r T h r A r g A s p A l a をコードするコード鎖配列である。J

12は、配列5' -AAACTATTCCCTTCACT-3' を有し、ここに、1位のAはGでもよく、4位のAはTでもよい。これは、JunSIのアミノ酸SerGlyAsnSerPhe（図16のアミノ酸263～268）をコードするコード鎖配列（図16のヌクレオチド875～892）に対応する非コード鎖配列である。J6は、配列5' -TAGGACATAGTGATTCACT-3' （図17のヌクレオチド700～717）を有し、本質的にJunVIのアミノ酸LeuGlyHisSerAspSerをコードするコード鎖配列である。J11は、配列5' -CCGGGATCCTAACAAATAACACATAT-3' を有し、ここに、ヌクレオチド1～9は、クローニング目的のためにBamHI制限部位をコードしており、ヌクレオチド10～27は図17のヌクレオチド1165～1182（JunVIの3' 非翻訳領域内）に相補的なコード鎖配列に対応する。ク

ローンpUC19JS45aの配列は、図16のヌクレオチド527～1170に対応する。ローンpUC29JV49iiaの配列は、図17のヌクレオチド537～1278に対応する。

JunSIの完全長クローンをPCRを用いて増幅した。オリゴヌクレオチドJ7及びJ10を、PCR反応において、上記のように、*J. sabinoides*の二本鎖のリンカー結合されたcDNAと共に用いた。J7は、配列5' -CCCGAATTCAATGGCTTCCCCATGCTTA-3' を有し、ここに、ヌクレオチド1～9は、クローニング目的のために加えられたEcoRI制限部位をコードし、ヌクレオチド10～27（図16のヌクレオチド26～43に対応する）は、JunSIのアミノ酸MetAlaSerProCysLeu（図16のアミノ酸-21～-16）をコードするコード鎖配列である。J10は、配列5' -CCGGGATCCGTTTCATAAGCAAGATT-3' を有し、ここに、ヌクレオチド1～9は、クローニング目的のために加えられたBamHI制限部位をコードし、ヌクレオチド10～27は、JunSIの3' 非翻訳領域からのヌクレオチド1140～1157（図16）に相補的な非コード鎖配列である。PCR生成物（JS53iiと呼ぶ）は、1%アガロースミニゲル上でEtBr染色して調べたときに、約1200bpのバンドを与えた。このJS5

3 i i P C R からの D N A を、実施例 3 に記載したようにして回収した。沈殿及び 70% E t O H での洗浄の後に、この D N A を、15 μl の反応中で E c o R I 及び B a m H I で同時に消化し、調製用 1% G T G SeaPlaque 低融点ゲル（メイン、Rockport 在、FMC）中で電気泳動した。適当な寸法の D N A バンドを、E t B r 染色により可視化

し、取り出し、市販の配列決定用キット（Sequenasekit, オハイオ、Cleveland 在、U. S. Biochemicals）を用いるジデオキシチーンターミネーション法（Sanger 等、前出）による配列決定のために、適当に消化した p U C 1 9 中にライゲーションした。その結果生成したクローン、p U C 1 9 J S 5 3 i i b を、M 1 3 用の順及び逆方向プライマー（マサチューセッツ、Beverly 在、N. E. Biolabs）及び内部シーケンシングプライマー J 4 を用いて部分的に配列決定した。この p U C 1 9 J S 5 3 i i b の配列を決定したが、それは、クローン p U C 1 9 J S 1 7 d 、p U C 1 9 J S 4 2 e 及び p U C 1 9 J S 4 5 a から得られたものと同一であった。このクローン p U C 1 9 J S 5 3 i i b のヌクレオチド配列は、図 1 6 のヌクレオチド 2 6 ~ 1 1 5 7 に対応する。

JunsI のヌクレオチド及び予想されるアミノ酸配列を図 1 6 に示す。JunsI は、図 1 6 のヌクレオチド 2 6 ~ 1 1 2 6 に対応する 1 1 0 1 ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを有する（367 アミノ酸の蛋白質をコードし得る）。図 1 6 のヌクレオチド 1 ~ 2 5 及び 1 1 3 0 ~ 1 1 7 0 は、それぞれ、5' 及び 3' 非翻訳領域である。図 1 6 のヌクレオチド 2 6 ~ 2 8 によりコードされる開始 M e t は、植物における開始 M e t を含むコンセンサス配列（AACAATGGC；Lutcke 等、前出）と 89% の同一性を有する図 1 6 のヌクレオチド 2 3 ~ 3 0 （AAA AATAGGC）中に同定された。この開始 M e t を

コードするコドンの直 5' 側には、インフレームの終止コドンもある。図 1 6 のアミノ酸 - 2 1 ~ - 1 は、予想されるリーダー配列に対応する。JunsI の成熟型のアミノ末端は、精製した JunsI の直接蛋白質配列分析（Gross 等、前出）により図 1 6 のアミノ酸 1 として同定された。JunsI の成熟型は、図 1 6 のアミノ酸 1

～346に対応するが、予想される分子量37.7kDaを有する。JunsIは、共通配列Asn-Xxx-Ser/Thrを有する、3つの潜在的なN結合グリコシレーション部位を有する。

JunvIの核酸及び予想されるアミノ酸配列を図17に示す。ヌクレオチド1～35及び1130～1170は、それぞれ、5'及び3'非翻訳領域である。図17のヌクレオチド36～38によりコードされる開始ヌクレオチドは、植物における開始Metを含むコンセンサス配列(AACAATGGC; Lutcke等、前出)と89%の同一性を有する図17のヌクレオチド23～30(AAAAATGGC)中に同定された。JunsI(図16)及びJunvI(図17)の核酸は、この開始Metの周りの領域において同一である。図17の5'非翻訳領域には2つのインフレームの終止コドンもある。JunvIは、図17のヌクレオチド36～1145に対応する1,100ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを有し、それは、370アミノ酸の蛋白質をコードし得る。図17のヌクレオチド1146～1148は終止コドンをコードして

いる。JunvIのアミノ酸-21～-1(図17)は、予想されるリーダー配列に対応する。このJunvIの成熟型のアミノ末端は、CryjI(図4a)及びJunsI(図16)の配列との比較により、図17のアミノ酸1として同定された。図17のアミノ酸1～349に対応するJunvIの成熟型は、予想される分子量38.0kDaを有する。JunvIは、共通配列Asn-Xxx-Ser/Thrを有する4つの潜在的N結合グリコシレーション部位を有する。

表Iに示すように、JunsIとJunvIの成熟型のアミノ酸配列は、互いに80.9%相同(75.4%同一であり、5.5%類似)である。JunsI及びCryjIの成熟型のアミノ酸配列は、87%相同(80.1%同一であり、6.9%類似)であり、JunvI及びCryjIの成熟型の配列は、80.5%相同(72.5%同一であり、8%類似)である。実施例6でT細胞エピトープを含むとして同定されたCryj1ペプチド配列と対応するJunsI及びJunvI配列との間の相同性も又、非常に高い。例えば、CryjIのアミノ酸211～230に対応するペプチドCJ1-22(図13)は、主要T細胞エピトープを含む(図14)。CJ1-22は、JunsI

及びJunvIそれぞれの対応する領域と95%の同一性（19/20の同一アミノ酸）及び85%の相同意性（16/20の同一アミノ酸、1/20の類似アミノ酸）を有する。この高い配列相同意性は、CryjIにより引き起こされるアレルギー疾患の治療において有効な免疫療法は、CryjI相同物により引き起こされるアレルギー疾患の治療においても有効であり得るということを示唆する。すべての核酸及びアミノ酸分析は、PCGENE（カリフォルニア、Mountain View在、Intelli genetics）に含まれるソフトウェアを用いて行なった。

表 I

<u>蛋白質／ペプチド 比較</u>	<u>同一性</u>	<u>類似性</u>	<u>全 相同意性</u>
JunvI 対 JunvI	75.4%	5.5%	80.9%
JunvI 対 CryjI	80.1%	6.9%	87.9%
JunvI 対 CryjI	72.5%	8.0%	80.5%
CJ1-22 対 JunvI ₂₁₁₋₂₃₀	95.0%	0.0%	95.0%
CJ1-22 対 JunvI ₂₁₁₋₂₃₀	80.0%	5.0%	85.0%

実施例 10

C. japonica, J. sabinooides, J. virginiana
及び C. arizonicar RNA のノーザンプロット分析

C. japonica, J. sabinooides、及び J. virginiana 花粉から分離した RNA についてノーザンプロット分析を行った。合衆国（例 3）及び日本（例 4）の両方で捕集した C. japonica 花粉からの RNA を調べた。本質的に上記の

Sambrook の方法を用いて、各々の RNA 15 μg を、ホルムアルデヒド 3.8% 及び 1X MOPS (20X = 0.4M MOPS, 0.02MEDTA, 0.1M NaOAc, pH 7.0) 溶液を含有する 1.2% アガロースゲル上で泳動した。RNA 試料（初めに酢酸ナトリウム 1/10 容積、エタノール 2 容積で沈殿させて容積を減少させ、dH₂O 5.5 μl に再懸濁させた）を、

最終濃度ホルムアルデヒド 1.5%、ホルムアミド 4.2%、及び 1.3 X MOPS 溶液を有するローディング色素を含有するホルムアルデヒド／ホルムアミド緩衝液 10 μl により泳動した。試料を 10 × SSC (20X = 3M NaCl, 0.3M クエン酸ナトリウム) におけるキャピラリートランスファーにより Genescreen Plus (NEN Research Products, マサチューセッツ、ボストン) に移した後に、膜を 80°C で 2 時間ベークし、3 分間紫外線照射した。膜のプレハイブリダイゼーションは、4 mL の 0.5M NaPO₄ (pH 7.2)、1 mM EDTA、1% BSA、及び 7% SDS 中 60°C において 1 時間であった。アンチセンスプローブを非対称性 PCR (McCabe, P. C., PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Innis, M. 等、編集、Academic Press, ボストン、(1990)、76~

83 頁における) により低メルトアガロース (例 3 に記載する) において JC 91a の増幅で合成した。この場合、2 μl の DNA を 2 μl の dNTP ミックス (0.167 mM dATP, 0.167 mM dTTP, 0.167 mM dGTP, 及び 0.33 mM dCTP)、2 μl の 10 × PCR 緩衝液、10 μl の ³²P-dCTP (100 μCi; Amersham) イリノイ、アーリントンハイツ)、1 μl (100 pMol) のアンチセンスプライマー CP-17, 0.5 μl の Taq ポリメラーゼ、及び dH₂O により増幅して 20 μl にする。10 × PCR 緩衝液、dNTP 及び Taq ポリメラーゼは Perkin Elmer Cetus (コネチカット、ノーウォーク) からのものであった。増幅は 94°C において 45 秒間 30 回数変性し、プライマーを 60°C において 45 秒間アニールしてテンプレートにしあつ 72°C において 1 分間鎖延長することからなるものであった。反応を、TE 100 μl を加えることによって停止させ、プローブを 3 cc の G-50 スピンカラム (TE で平衡にしたグラスウールを詰めた 3 cc のシリジン中の 2 ml の G-50 Sephadex [Pharmacia, スエーデン、アップサラ]) で回収し、1500 Tricarb Liquid Scintillation Counter (Packard, イリ

ノイ、ダウナースグロウブ) で

カウントした。プローブをプレハイブリダイジング緩衝液に $1 \text{ } 0^6 \text{ cpm/m}^l$ で加え、プレハイブリダイゼーションを 60°C において 16 時間行った。プロットを高緊縮条件: $3 \times 65^\circ\text{C}$ における $0.2 \times \text{SSC}/1\% \text{ SDS}$ による 15 分、において行い、次いでプラスチックラップにラップして -80°C のフィルムに暴露した。このノーザンプロットの 7 時間暴露は、*C. japonica* (合衆国) (図 19 a、レーン 1)、*C. japonica* (日本) (図 19 a、レーン 2)、*J. sabinooides* (図 19 a、レーン 3) 及び *J. virginiana* (図 19 a、レーン 4) RNAについておよそ 1.2 kb において单一の厚いバンドを示した。このバンドは cDNA の PCR 分析によって予測される通りの *Cryj I*、*Juns I* 及び *Junv I* について予期されるサイズである。各々のレーンにおける異なるバンド強さはゲル上に負荷された DNA の量の相違を反映し得る。分子量基準 1.6 及び 1.0 kb の位置を図 19 a 及び 19 b に示す。

J. sabinooides 及び *C. arizonica* から分離した RNA を別のノーザンプロットにおいて分析した。*J. sabinooides* からの全 RNA $5 \mu\text{g}$ 及び *C. arizonica* からの全 RNA $5 \mu\text{g}$ を記載する通りにして精査した。このプロットにおいて、*J. sabinooides* (図 19 a) レーン 1) 及び *C. arizonica* (図 19 b、レーン

2) の両方について 1.2 kb バンドが観測され、*C. arizonica* が *Cryj I* 相同体を有することを示す。他の関連するツリーもまた相同体を有するものと予想される。

本発明をその好適な実施態様に関連して説明したが、その他の実施態様は同じ結果を達成することができる。本発明への変更及び変更態様は当業者にとり自明であると思われかつ発明の真の精神及び範囲に従うかかる変更態様及び均等物をすべて添付する請求の範囲に含む意図である。

配列表

(1) 一般の情報：

(i) 出願人：Griffith, Irwin J.

Pollock, Joanne, Bond Julian

(ii) 発明の名称：杉花粉由来のアレルゲン性蛋白質及び
ペプチド

(iii) 配列の数：25

(iv) 通信住所：

(A) 名宛人：ImmunoLogic Pharmaceutical
Corporation

(B) 通り：610 Lincoln Street

(C) 市：Waltham

(D) 州：マサチューセッツ

(E) 国：USA

(F) 郵便番号：02154

(v) コンピューター読み取り可能形式：

(A) 媒体型：フロッピーディスク

(B) コンピューター：IBM PC 互換機

(C) オペレーティングシステム：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：PatentIn Release #1.0,
Version #1.25

(vi) 現出願のデータ：

(A) 出願番号：

(B) 出願日：

(C) 分類：

(viii) 代理人／代理業者の情報：

(A) 名称：Stacey L.Channing

(B) 登録番号：31,095

(C) 参照／ドケット番号：IPC-025CCC PCT

(ix) 電信用情報 :

- (A) 電話 : (617)466-6000
- (B) テレファックス : (617)466-6040

(2) 配列番号1の情報 :

(i) 配列特性 :

- (A) 長さ : 1 3 3 7 塩基対
- (B) 型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : cDNA to mRNA

(vi) 起源 :

- (A) 生物名 : Cryptomeria japonica

(ix) 配列の特徴 :

- (A) 特徴を表わす記号 : CDS
- (B) 存在位置 : 6 6 . . 1 1 8 7

(ix) 配列の特徴 :

- (A) 特徴を表わす記号 : mat_peptide
- (B) 存在位置 : 1 2 9 . . 1 1 8 7

(xi) 配列(配列番号1) :

AGTCAATCTG CTCATAATCA TAGCATAGCC GTATAGAAAC AAATTCTACA CTCTGCTACC	60
AAAAA ATG GAT TCC CCT TGC TTA GTA GCA TTA CTG GTT TTC TCT TTT Met Asp Ser Pro Cys Leu Val Ala Leu Leu Val Phe Ser Phe	107
-21 -20 -15 -10	
GTA ATT GGA TCT TGC TTT TCT GAT AAT CCC ATA GAC AGC TGC TGG AGA Val Ile Gly Ser Cys Phe Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Tyr Arg	155
-5 1 5	
GGA GAC TCA AAC TGG GCC CAA AAT AGA ATG AAG CTC GCA GAT TGT GCA Gly Asp Ser Asn Trp Ala Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala	203
10 15 20 25	
GTG GGC TTC GGA AGC TCC ACC ATG GGA GGC AAG GGA GGA GAT CTT TAT Val Gly Phe Gly Ser Ser Thr Met Gly Gly Lys Gly Asp Leu Tyr	251
30 35 40	
ACG GTC ACG AAC TCA GAT GAC GAC CCT GTG AAT CCT GCA CCA GGA ACT Thr Val Thr Asn Ser Asp Asp Pro Val Asn Pro Ala Pro Gly Thr	299
45 50 55	
CTG CGC TAT GGA GCA ACC CGA GAT AGG CCC CTG TGG ATA ATT TTC AGT Leu Arg Tyr Gly Ala Thr Arg Asp Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Ser	347

	60	65	70	
GGG AAT ATG AAT ATA AAG CTC AAA ATG CCT ATG TAC ATT GCT GGG TAT Gly Asn Met Asn Ile Lys Leu Lys Met Pro Met Tyr Ile Ala Gly Tyr	75	80	85	395
AAG ACT TTT GAT GGC AGG GCA CAA GTT TAT ATT GGC AAT GGC GGT Lys Thr Phe Asp Gly Arg Gly Ala Gln Val Tyr Ile Gly Asn Gly Gly	90	95	100	443
CCC TGT GTG TTT ATC AAG AGA GTT ACC AAT GTT ATC ATA CAC GGT TTG Pro Cys Val Phe Ile Lys Arg Val Ser Asn Val Ile Ile His Gly Leu	110	115	120	491
TAT CTG TAC GGC TGT AGT ACT AGT GTT TTG GGG AAT GTT TTG ATA AAC Tyr Leu Tyr Gly Cys Ser Thr Ser Val Leu Gly Asn Val Leu Ile Asn	125	130	135	539
GAG AGT TTT GGG GTG GAG CCT GTT CAT CCT CAG GAT GGC GAT GCT CTT Glu Ser Phe Gly Val Glu Pro Val His Pro Gln Asp Gly Asp Ala Leu	140	145	150	587
ACT CTG CGC ACT GCT ACA AAT ATT TGG ATT GAT CAT AAT TCT TTC TCC Thr Leu Arg Thr Ala Thr Asn Ile Trp Ile Asp His Asn Ser Phe Ser	155	160	165	635
AAT TCT TCT GAT GGT CTG GTC GAT GTC ACT CTT ACT TCG ACT GGA GTT Asn Ser Ser Asp Gly Leu Val Asp Val Thr Leu Thr Ser Thr Gly Val	170	175	180	683
ACT ATT TCA AAC AAT CTT TTT TTC AAC CAT CAT AAA GTG ATG TTG TTA Thr Ile Ser Asn Asn Leu Phe Asn His His Lys Val Met Leu Leu	190	195	200	731
GGG CAT GAT GAT GCA TAT AGT GAT GAC AAA TCC ATG AAG GTG ACA GTG Gly His Asp Asp Ala Tyr Ser Asp Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val	205	210	215	779
GCG TTC AAT CAA TTT GGA CCT AAC TGT GGA CAA AGA ATG CCC ACG GCA Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asn Cys Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala	220	225	230	827
CGA TAT GGA CTT GTC CAT GTT GCA AAC AAT AAT TAT GAC CCA TGG ACT Arg Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Trp Thr	235	240	245	875
ATA TAT GCA ATT GGT GGG AGT TCA AAT CCA ACC ATT CTA AGT GAA GGG Ile Tyr Ala Ile Gly Gly Ser Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly	250	255	260	923
AAT AGT TTC ACT GCA CCA AAT GAG ACC TAC AAC AAG CAA GTA ACC ATA Asn Ser Phe Thr Ala Pro Asn Glu Ser Tyr Lys Lys Gln Val Thr Ile	270	275	280	971
CGT ATT GGA TGC AAA ACA TCA TCA TCT TGT TCA AAT TGG GTG TGG CAA Arg Ile Gly Cys Lys Thr Ser Ser Cys Ser Asn Trp Val Trp Gln	285	290	295	1019

TCT ACA CAA GAT GTT TTT TAT AAT CGA GCT TAT TTT GTA TCA TCA GGG Ser Thr Gln Asp Val Phe Tyr Asn Cys Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly 300 305 310	1067
AAA TAT GAA GGG GGT AAT ATA TAC ACA AAG AAA GAA CCT TTC AAT GTT Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val 315 320 325	1115
GAG AAT GGG AAT GCA ACT CCT CAA TTG ACA AAA AAT GCT GGG GTT TTA Glu Asn Gly Asn Ala Thr Pro Gln Leu Thr Lys Asn Ala Gly Val Leu 330 335 340 345	1163
ACA TGC TCT CTC TCT AAA CGT TGT TGATGATCCA TATATTCTAG CATGTTGTAC Thr Cys Ser Leu Ser Lys Arg Cys 350	1217
TATCTAAATT AACATCAACA AGAAAATATA TCATGATGTA TATTGTTGTA TTGATGTCAA ATAAAAAATG TATCTTTTAC TATTAAAAAA AAAAATGATC GATCGGACGG TACCTCTAGA	1277
	1337

(2) 配列番号2の情報：

(i) 配列特性：

- (A) 長さ：374アミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：蛋白質

(xi) 配列(配列番号2)：

```

Met Asp Ser Pro Cys Leu Val Ala Leu Leu Val Phe Ser Phe Val Ile
-21 -20      -15          -10

Gly Ser Cys Phe Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg Gly Asp
-5           1           5          10

Ser Asn Trp Ala Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala Val Gly
15          20          25

Phe Gly Ser Ser Thr Met Gly Gly Lys Gly Gly Asp Leu Tyr Thr Val
30          35          40

Thr Asn Ser Asp Asp Pro Val Asn Pro Ala Pro Gly Thr Leu Arg
45          50          55

Tyr Gly Ala Thr Arg Asp Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Ser Gly Asn
60          65          70          75

Met Asn Ile Lys Leu Lys Met Pro Met Tyr Ile Ala Gly Tyr Lys Thr
80          85          90

Phe Asp Gly Arg Gly Ala Gln Val Tyr Ile Gly Asn Gly Gly Pro Cys
95          100         105

Val Phe Ile Lys Arg Val Ser Asn Val Ile Ile His Gly Leu Tyr Leu

```

110	115	120													
Tyr	Gly	Cys	Ser	Thr	Ser	Val	Leu	Gly	Asn	Val	Leu	Ile	Asn	Glu	Ser
125						130					135				
Phe	Gly	Val	Glu	Pro	Val	His	Pro	Gln	Asp	Gly	Asp	Ala	Leu	Thr	Leu
140						145					150				155
Arg	Thr	Ala	Thr	Asn	Ile	Trp	Ile	Asp	His	Asn	Ser	Phe	Ser	Asn	Ser
					160				165					170	
Ser	Asp	Gly	Leu	Val	Asp	Val	Thr	Leu	Thr	Ser	Thr	Gly	Val	Thr	Ile
						175			180				185		
Ser	Asn	Asn	Leu	Phe	Phe	Asn	His	His	Lys	Val	Met	Leu	Leu	Gly	His
						190			195				200		
Asp	Asp	Ala	Tyr	Ser	Asp	Asp	Lys	Ser	Met	Lys	Val	Thr	Val	Ala	Phe
						205			210			215			
Asn	Gln	Phe	Gly	Pro	Asn	Cys	Gly	Gln	Arg	Met	Pro	Arg	Ala	Arg	Tyr
						220			225			230			235
Gly	Leu	Val	His	Val	Ala	Asn	Asn	Asn	Tyr	Asp	Pro	Trp	Thr	Ile	Tyr
						240			245				250		
Ala	Ile	Gly	Gly	Ser	Ser	Asn	Pro	Thr	Ile	Leu	Ser	Glu	Gly	Asn	Ser
						255			260				265		
Phe	Thr	Ala	Pro	Asn	Glü	Ser	Tyr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Ile	Arg	Ile
						270			275				280		
Gly	Cys	Lys	Thr	Ser	Ser	Ser	Cys	Ser	Asn	Trp	Val	Trp	Gln	Ser	Thr
						285			290				295		
Gln	Asp	Val	Phe	Tyr	Asn	Gly	Ala	Tyr	Phe	Val	Ser	Ser	Gly	Lys	Tyr
						300			305			310			315
Glu	Gly	Gly	Asn	Ile	Tyr	Thr	Lys	Lys	Glu	Ala	Phe	Asn	Val	Glu	Asn
						320			325				330		
Gly	Asn	Ala	Thr	Pro	Gln	Leu	Thr	Lys	Asn	Ala	Gly	Val	Leu	Thr	Cys
						335			340				345		
Ser	Leu	Ser	Lys	Arg	Cys										
					350										

(2) 配列番号3の情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ: 17 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列(配列番号3):

GAYAAYCCNA THGAYWS
17

(2) 配列番号4の情報：

(i) 配列特性：

- (A) 長さ：25塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎮の数：一本鎮
- (D) トポロジー：直鎮状

(xi) 配列(配列番号4)：

GGGAATTCAA YTGGGCNCAR AAYSG
25

(2) 配列番号5の情報：

(i) 配列特性：

- (A) 長さ：23塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎮の数：一本鎮
- (D) トポロジー：直鎮状

(ix) 配列の特徴：

- (A) 特徴を表わす記号：modified_base
- (B) 存在位置：15
- (D) 他の情報：／mod_base= i

(xi) 配列(配列番号5)：

CTGCAGCCRT TYTCNACRTT RAA
23

(2) 配列番号6の情報：

(i) 配列特性：

- (A) 長さ：20塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎮の数：一本鎮
- (D) トポロジー：直鎮状

(ix) 配列の特徴：

- (A) 特徴を表わす記号：modified_base
- (B) 存在位置：6
- (D) 他の情報：／mod_base= i

(xi) 配列（配列番号6）：

TTCATNCKRT TYTGNGCCA
20

(2) 配列番号7の情報：

(i) 配列特性：

- (A) 長さ：25塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎮の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列（配列番号7）：

CCTGCAGCKR TTYTGNGCCC AARTT
25

(2) 配列番号8の情報：

(i) 配列特性：

- (A) 長さ：18塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎮の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列（配列番号8）：

ATGGATTCCC CTTGCTTA
18

(2) 配列番号9の情報：

(i) 配列特性：

- (A) 長さ：26塩基対
- (B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列（配列番号9）：

GGGAATTCTGA TAATCCCAT A GACAGC
26

(2) 配列番号10の情報：

(i) 配列特性：

(A) 長さ：17塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列（配列番号10）：

ATGCCTATGT ACATTCG
17

(2) 配列番号11の情報：

(i) 配列特性：

(A) 長さ：17塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列（配列番号11）：

GCAATGTACA TAGGCAT
17

(2) 配列番号12の情報：

(i) 配列特性：

(A) 長さ：18塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列（配列番号12）：

TCCAATTCTT CTGATGGT
18

(2) 配列番号13の情報：

(i) 配列特性：

- (A) 長さ：18塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列（配列番号13）：

TTTTGTCAAT TGAGGGAGT
18

(2) 配列番号14の情報：

(i) 配列特性：

- (A) 長さ：30塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列（配列番号14）：

CCTGCAGAAG CTTCATCAAC AACGTTAGA
30

(2) 配列番号15の情報：

(i) 配列特性：

- (A) 長さ：19塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列(配列番号15) :

TAGCAACTCC AGTCGAAGT
19

(2) 配列番号16の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 17塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎮の数: 一本鎮
- (D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列(配列番号16) :

TAGCTCTCAT TTGGTGCG
17

(2) 配列番号17の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 18塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎮の数: 一本鎮
- (D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列(配列番号17) :

TATGCAAATTG GTGGGAGT
18

(2) 配列番号18の情報:

(i) 配列特性:

- (A) 長さ: 20アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: N-terminal

(vi) 起源:

(A) 生物名 : Crytpomeria japonica

(ix) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表わす記号 : Modified-site

(B) 存在位置 : 7

(D) 他の情報 : /note="the amino acid at
position

7 is Ser, Cys, Thr, or His"

(xi) 配列 (配列番号 18) :

-Asp Asn Pro Ile Asp Ser Xaa Trp Arg Gly Asp Ser Asn Trp												
Ala Gln												
	1											
		5										
											10	
												:
15												
Asn Arg Met Lys												
		20										

(2) 配列番号 19 の情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 16 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(v) フラグメント型 : internal

(vi) 起源 :

(A) 生物名 : Crytpomeria japonica

(xi) 配列 (配列番号 19) :

Glu Ala Phe Asn Val Glu Asn Gly Asn Ala Thr Pro Gln Leu												
Thr Lys												
	1											
		5										
											10	
15												

(2) 配列番号 20 の情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 30 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列（配列番号20）：

GGGTCTAGAG GTACCGTCCG ATCGATCATT

30

(2) 配列番号21の情報：

(i) 配列特性：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列（配列番号21）：

GGGTCTAGAG GTACCGTCCG
20

(2) 配列番号22の情報：

(i) 配列特性：

(A) 長さ：13塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列（配列番号22）：

AATGATCGAT GCT
13

(2) 配列番号23の情報：

(i) 配列特性：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列（配列番号23）：

GGAATTCTCT AGACTGCAGG T
21

(2) 配列番号24の情報：

(i) 配列特性：

- (A) 長さ：35塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎮の数：一本鎮
- (D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列（配列番号24）

GGAATTCTCT AGACTGCAGG TTTTTTTTTT TTTTT 35

(2) 配列番号25の情報：

(i) 配列特性：

- (A) 長さ：5アミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(v) フラグメント型：N-terminal

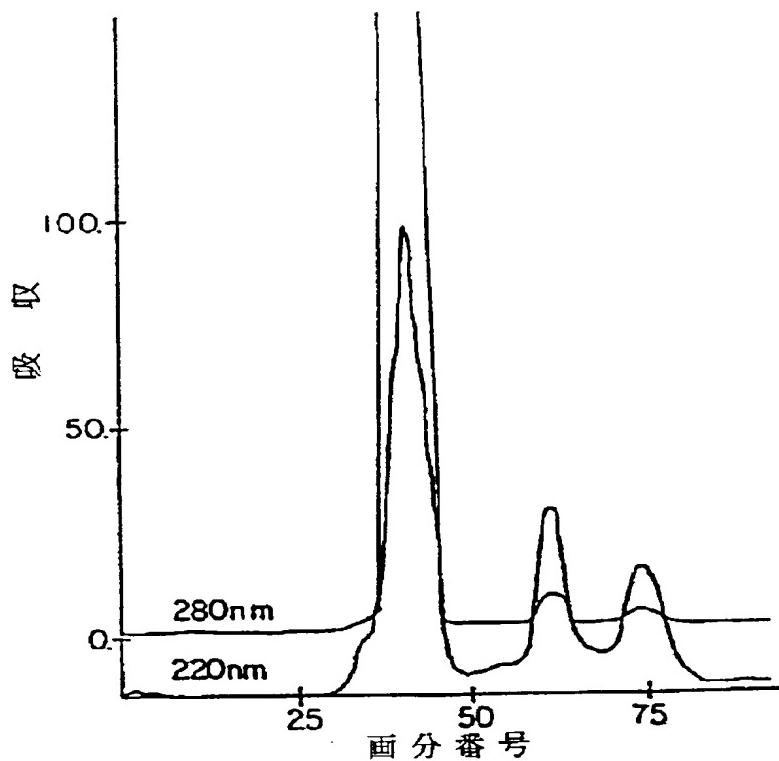
(vi) 起源：

(A) 生物名：Juniperus sabinaoides

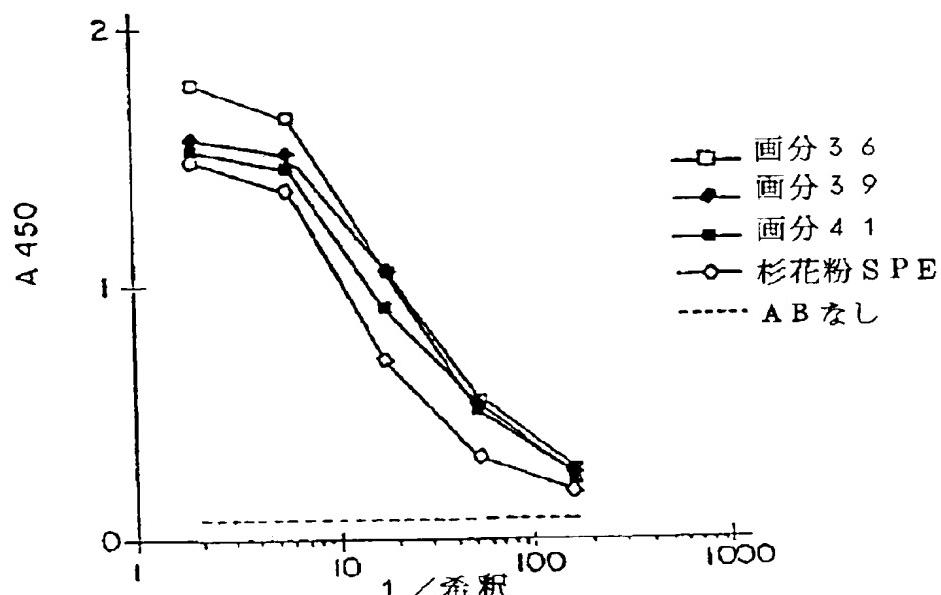
(xi) 配列（配列番号25）：

Asp Asn Pro Ile Asp
1 5

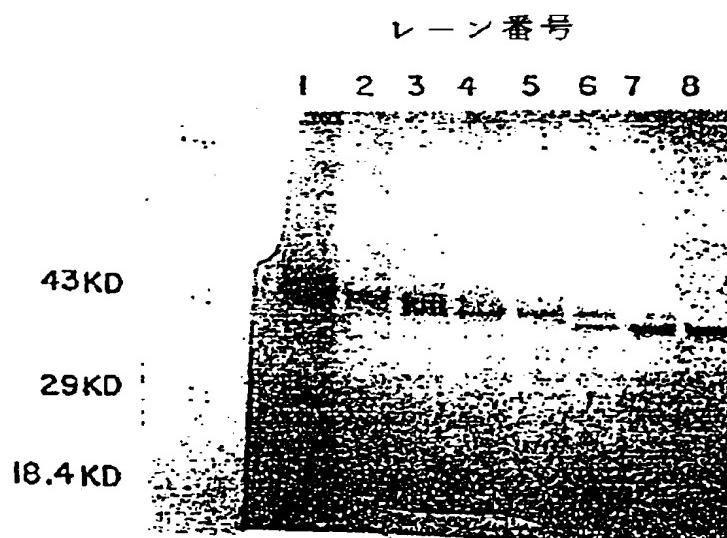
【図 1 a】

Fig. 1a

【図3】

Fig. 3

【図1b】

Fig. 1b

【図2】

• 1 2 3

Fig. 2

[図4]

5'-AGTCAATCTG CTCATAATCA TAGCATAGCC GTATAGAAAG AAATTCTACA CTCTGCTTAC 60
 AAAAA ATG GAT TCC CCT TGC TTA GTA GCA TTA CTG GTT TTC TCT TTT 107
 Met Asp Ser Pro Cys Leu Val Ala Leu Val Phe Ser Phe
 -21 -20 -15 -10

GTA ATT GGA TCT TGC TTT TCT GAT AAT CCC ATA GAC AGC TGC TGG AGA 155
 Val Ile Gly Ser Cys Phe Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg
 -5 1 5

GGA GAC TCA AAC TGG GCC CAA AAT AGA ATG AAG CTC GCA GAT TGT GCA 203
 Gly Asp Ser Asn Trp Ala Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala
 10 15 20 25

GTC GGC TTC GGA AGC TCC ACC ATG CGA GGC AAG GGA GAT CTT TAT 251
 Val Gly Phe Gly Ser Ser Thr Met Gly Gly Lys Gly Asp Leu Tyr
 30 35 40

ACG GTC ACG AAC TCA GAT GAC GAC CCT GTG AAT CCT GCA CCA GGA ACT 299
 Thr Val Thr Asn Ser Asp Asp Pro Val Asn Pro Ala Pro Gly Thr
 45 50 55

CTG CGC TAT GGA GCA ACC CGA GAT AGG CCC CTG TGG ATA ATT TTC AGT 347
 Leu Arg Tyr Gly Ala Thr Arg Asp Asp Pro Leu Trp Ile Ile Phe Ser
 60 65 70

Fig. 4

[图4]

GGG	AAT	ATG	AAT	ATA	AAG	CTC	AAA	ATG	CCT	ATG	TAC	ATT	GCT	GGG	TAT	395
Gly	Asn	Met	Asn	Ile	Lys	Lys	Leu	Lys	Met	Pro	Met	Tyr	Ile	Ala	Gly	Tyr
75				80												85
AAG	ACT	TTT	GAT	GGC	AGG	CGA	GCA	CAA	GTT	TAT	ATT	GCC	AAT	GCC	GGT	443
Lys	Thr	Phe	Asp	Gly	Arg	Gly	Ala	Gln	Val	Tyr	Ile	Gly	Asn	Gly	Gly	
90				95												100
CCC	TGT	GTG	TTT	ATC	AAG	AGA	GTT	AGC	AAT	GTT	ATC	ATC	CAC	GGT	TTG	491
Pro	Cys	Val	Phe	Ile	Lys	Arg	Val	Ser	Asn	Val	Ile	Ile	His	Gly	Leu	
																110
TAT	CTG	TAC	GGC	TGT	AGT	ACT	ACT	GTT	TTG	GGG	AAT	GTT	TTG	ATA	AAC	539
Tyr	Leu	Tyr	Gly	Cys	Ser	Thr	Ser	Val	Leu	Gly	Asn	Val	Leu	Ile	Asn	
																125
GAG	AGT	TTT	GGG	GTG	GAG	CCT	GTT	CAT	CCT	CAG	GAT	GGC	GAT	GCT	CTT	587
Glu	Ser	Phe	Gly	Val	Glu	Pro	Val	His	Pro	Gln	Asp	Gly	Asp	Ala	Leu	
																140
ACT	CTG	CGC	ACT	GCT	ACA	AAT	ATT	TGG	ATT	GAT	CAT	AAT	TCT	TTC	TCC	635
Thr	Leu	Arg	Thr	Ala	Thr	Asn	Ile	Trp	Ile	Asp	His	Asn	Ser	Phe	Ser	
																155
																160
																165

Fig. 4 cont.

[図4]

AAT	TCT	GAT	GGT	CTG	GTC	GAT	GTC	ACT	CTT	ACT	TCG	ACT	GGA	GTT	683	
Asn	Ser	Ser	Asp	Gly	Leu	Val	Asp	Val	Thr	Leu	Thr	Ser	Thr	Gly	Val	
170				175				180							185	
ACT	ATT	TCA	AAC	AAT	CTT	TTC	AAC	CAT	CAT	AAA	GTG	ATG	TTG	TTA	731	
Thr	Ile	Ser	Asn	Asn	Leu	Phe	Phe	Asn	His	His	Lys	Val	Met	Leu		
					190			195							200	
GGG	CAT	GAT	GAT	GCA	TAT	AGT	GAT	GAC	AAA	TCC	ATG	AAG	GTG	ACA	779	
Gly	His	Asp	Asp	Ala	Tyr	Ser	Asp	Asp	Lys	Ser	Met	Lys	Val	Thr	Val	
				205				210							215	
GCG	TTC	AAT	CAA	TTT	GGA	CCT	AAC	TGT	GGA	CAA	AGA	ATG	CCC	AGG	GCA	827
Ala	Phe	Asn	Gln	Phe	Gly	Pro	Asn	Cys	Gly	Gln	Arg	Met	Pro	Arg	Ala	
				220				225							230	
CGA	TAT	GGA	CTT	GTA	CAT	GTT	GCA	AAC	AAT	ATAT	TAT	GAC	CCA	TGG	ACT	875
Arg	Tyr	Gly	Leu	Val	His	Val	Ala	Asn	Asn	Asn	Tyr	Asp	Pro	Trp	Thr	
	235				240				245							
ATA	TAT	GCA	ATT	GGT	GGG	AGT	TCA	AAT	CCA	ACC	ATT	CTA	AGT	GAA	GGG	923
Ile	Tyr	Ala	Ile	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Pro	Thr	Ile	Leu	Ser	Glu	
				250				255				260			265	

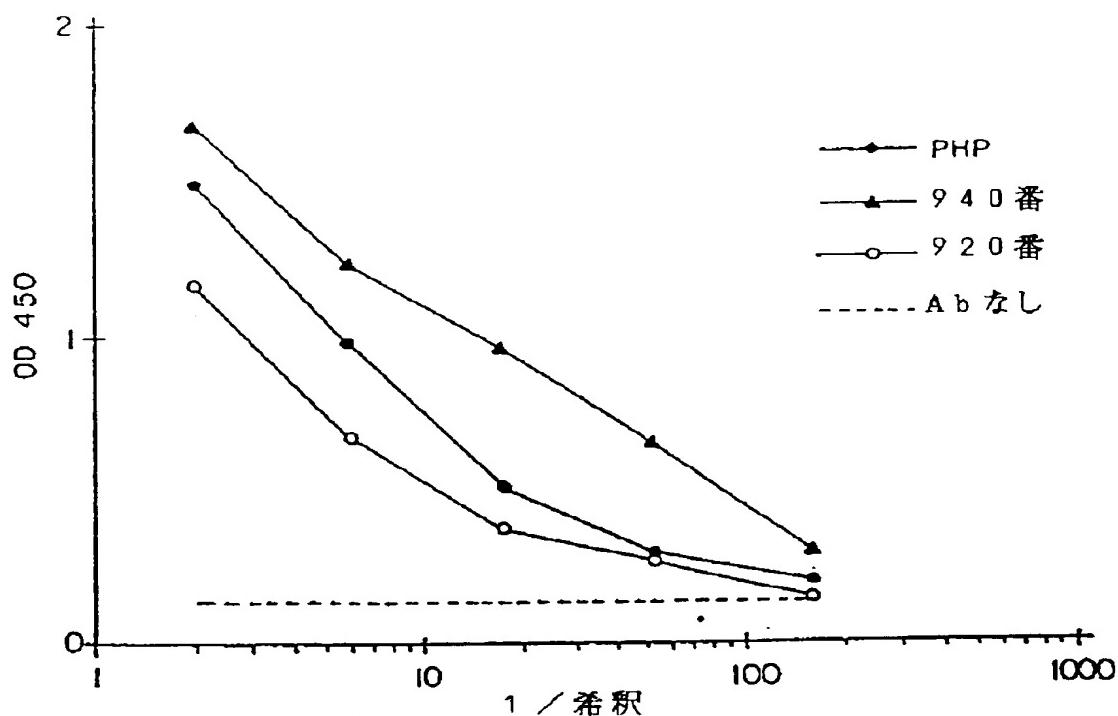
Fig. 4 cont.

[图4]

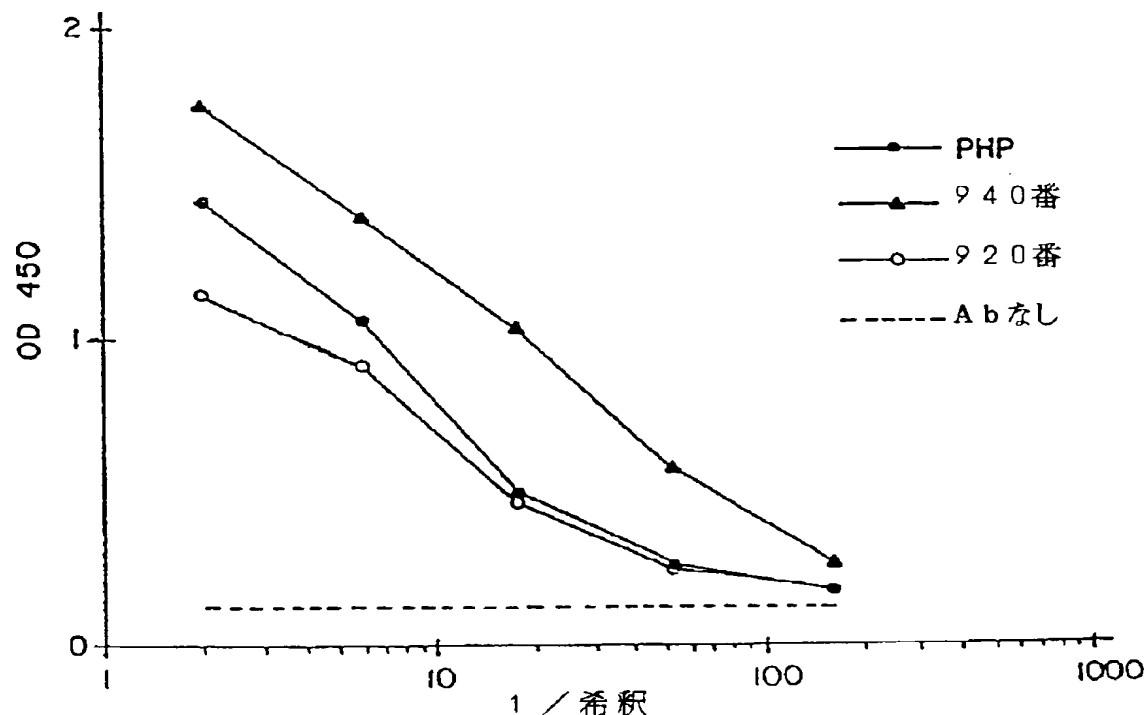
AAT AGT TTC ACT GCA CCA AAT GAG AGC TAC AAG AAG CAA GTA ACC ATA Asn Ser Phe Thr Ala Pro Asn Glu Ser Tyr Lys Glu Val Thr Ile	270	275	280	285	290	295	300	305	310	315	320	325	330	335	340	345	350	355	360	365	370	375	380	385	390	395	400	405	410	415	420	425	430	435	440	445	450	455	460	465	470	475	480	485	490	495	500	505	510	515	520	525	530	535	540	545	550	555	560	565	570	575	580	585	590	595	600	605	610	615	620	625	630	635	640	645	650	655	660	665	670	675	680	685	690	695	700	705	710	715	720	725	730	735	740	745	750	755	760	765	770	775	780	785	790	795	800	805	810	815	820	825	830	835	840	845	850	855	860	865	870	875	880	885	890	895	900	905	910	915	920	925	930	935	940	945	950	955	960	965	970	975	980	985	990	995	1000
CGT ATT GGA TGC AAA ACA TCA TCA TCT TGT TCA AAT TGC GTC TGG CAA Arg Ile Gly Cys Lys Thr Ser Ser Cys Ser Asn Trp Val Trp Gln	285	290	295	300	305	310	315	320	325	330	335	340	345	350	355	360	365	370	375	380	385	390	395	400	405	410	415	420	425	430	435	440	445	450	455	460	465	470	475	480	485	490	495	500	505	510	515	520	525	530	535	540	545	550	555	560	565	570	575	580	585	590	595	600	605	610	615	620	625	630	635	640	645	650	655	660	665	670	675	680	685	690	695	700	705	710	715	720	725	730	735	740	745	750	755	760	765	770	775	780	785	790	795	800	805	810	815	820	825	830	835	840	845	850	855	860	865	870	875	880	885	890	895	900	905	910	915	920	925	930	935	940	945	950	955	960	965	970	975	980	985	990	995	1000			
TCT ACA CAA GAT GTT TTT TAT AAT GGA GCT TAT TTT GTA TCA TCA GGG Ser Thr Gln Asp Val Phe Tyr Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly	300	305	310	315	320	325	330	335	340	345	350	355	360	365	370	375	380	385	390	395	400	405	410	415	420	425	430	435	440	445	450	455	460	465	470	475	480	485	490	495	500	505	510	515	520	525	530	535	540	545	550	555	560	565	570	575	580	585	590	595	600	605	610	615	620	625	630	635	640	645	650	655	660	665	670	675	680	685	690	695	700	705	710	715	720	725	730	735	740	745	750	755	760	765	770	775	780	785	790	795	800	805	810	815	820	825	830	835	840	845	850	855	860	865	870	875	880	885	890	895	900	905	910	915	920	925	930	935	940	945	950	955	960	965	970	975	980	985	990	995	1000						
AAT TAT GAA GAA GGT AAT ATA TAC ACA AAC AAA GAA GCT TTC AAT GTT Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Glu Ala Phe Asn Val	315	320	325	330	335	340	345	350	355	360	365	370	375	380	385	390	395	400	405	410	415	420	425	430	435	440	445	450	455	460	465	470	475	480	485	490	495	500	505	510	515	520	525	530	535	540	545	550	555	560	565	570	575	580	585	590	595	600	605	610	615	620	625	630	635	640	645	650	655	660	665	670	675	680	685	690	695	700	705	710	715	720	725	730	735	740	745	750	755	760	765	770	775	780	785	790	795	800	805	810	815	820	825	830	835	840	845	850	855	860	865	870	875	880	885	890	895	900	905	910	915	920	925	930	935	940	945	950	955	960	965	970	975	980	985	990	995	1000									
CAG AAT GGG AAT GCA ACT CCT CAA TTG ACA AAA AAT GCT GGG GTT TTA Glu Asn Gly Asn Ala Thr Pro Gln Leu Thr Lys Asn Ala Gly Val Leu	330	335	340	345	350	355	360	365	370	375	380	385	390	395	400	405	410	415	420	425	430	435	440	445	450	455	460	465	470	475	480	485	490	495	500	505	510	515	520	525	530	535	540	545	550	555	560	565	570	575	580	585	590	595	600	605	610	615	620	625	630	635	640	645	650	655	660	665	670	675	680	685	690	695	700	705	710	715	720	725	730	735	740	745	750	755	760	765	770	775	780	785	790	795	800	805	810	815	820	825	830	835	840	845	850	855	860	865	870	875	880	885	890	895	900	905	910	915	920	925	930	935	940	945	950	955	960	965	970	975	980	985	990	995	1000												
ACA TGC TCT CTC TCT AAA CGT TGT TGATGATGCA TATATTCTAG CATGTTGTCAC Thr Cys Ser Leu Ser Lys Arg Cys	350	355	360	365	370	375	380	385	390	395	400	405	410	415	420	425	430	435	440	445	450	455	460	465	470	475	480	485	490	495	500	505	510	515	520	525	530	535	540	545	550	555	560	565	570	575	580	585	590	595	600	605	610	615	620	625	630	635	640	645	650	655	660	665	670	675	680	685	690	695	700	705	710	715	720	725	730	735	740	745	750	755	760	765	770	775	780	785	790	795	800	805	810	815	820	825	830	835	840	845	850	855	860	865	870	875	880	885	890	895	900	905	910	915	920	925	930	935	940	945	950	955	960	965	970	975	980	985	990	995	1000																
TATCTAAATT AACATCAACA AGAAATAATA TCATGATGTA TATTGTTGTA TTGATGTCAC ATAAATAAATG TATCTTTAAC TATTAATAAA AAAATAATGATC GATCCGACGG TACCTCTAGA-3'	1217	1277	1337	1407	1477	1547	1617	1687	1757	1827	1897	1967	2037	2107	2177	2247	2317	2387	2457	2527	2597	2667	2737	2807	2877	2947	3017	3087	3157	3227	3297	3367	3437	3507	3577	3647	3717	3787	3857	3927	3997	4067	4137	4207	4277	4347	4417	4487	4557	4627	4697	4767	4837	4907	4977	5047	5117	5187	5257	5327	5397	5467	5537	5607	5677	5747	5817	5887	5957	6027	6097	6167	6237	6307	6377	6447	6517	6587	6657	6727	6797	6867	6937	6997	7067	7137	7207	7277	7347	7417	7487	7557	7627	7697	7767	7837	7907	7977	8047	8117	8187	8257	8327	8397	8467	8537	8607	8677	8747	8817	8887	8957	9027	9097	9167	9237	9307	9377	9447	9517	9587	9657	9727	9797	9867	9937	10007																				

Fig. 4 cont.

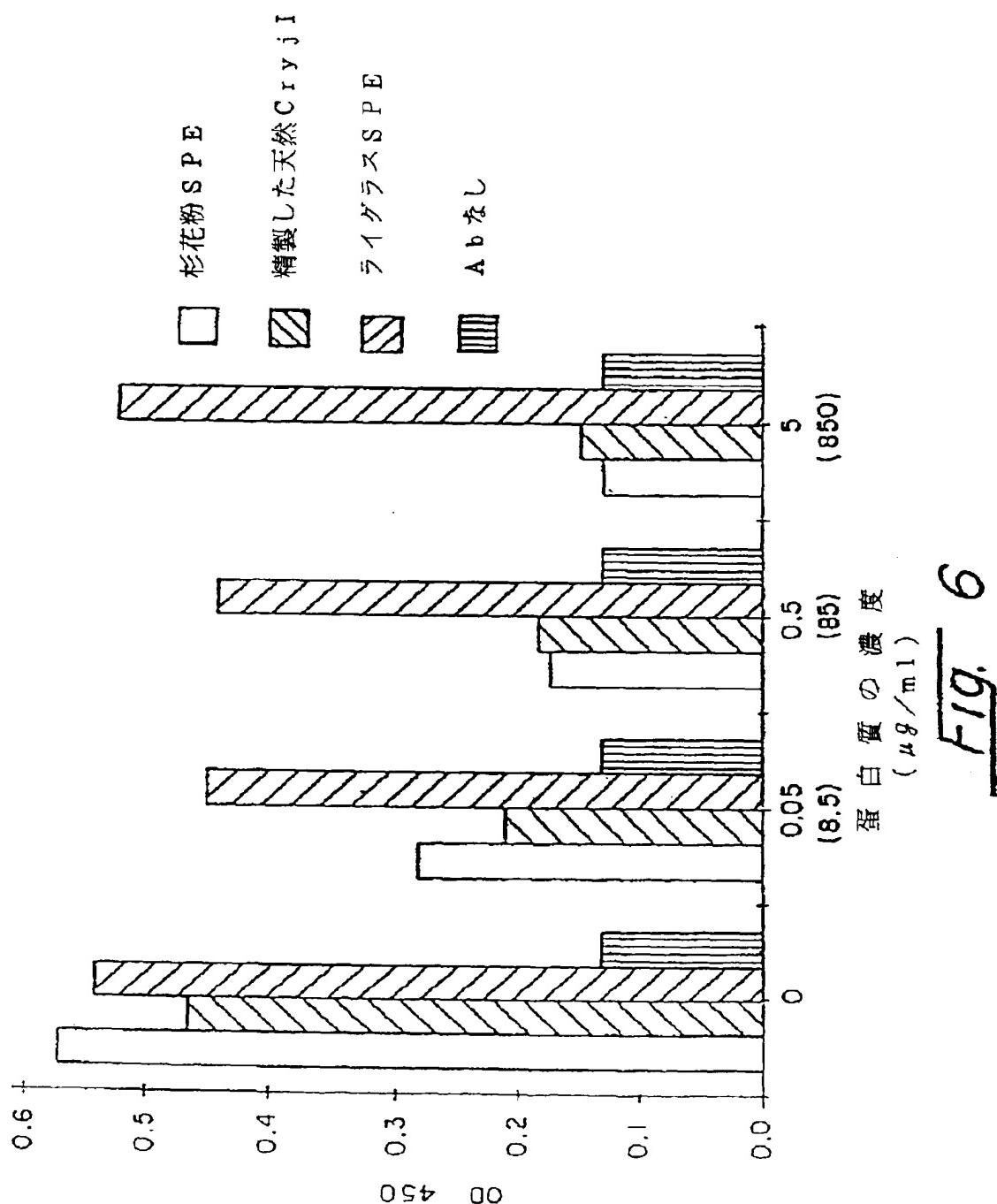
【図5a】

Fig 5a

【図5b】

Fig. 5b

【図6】



【図7】

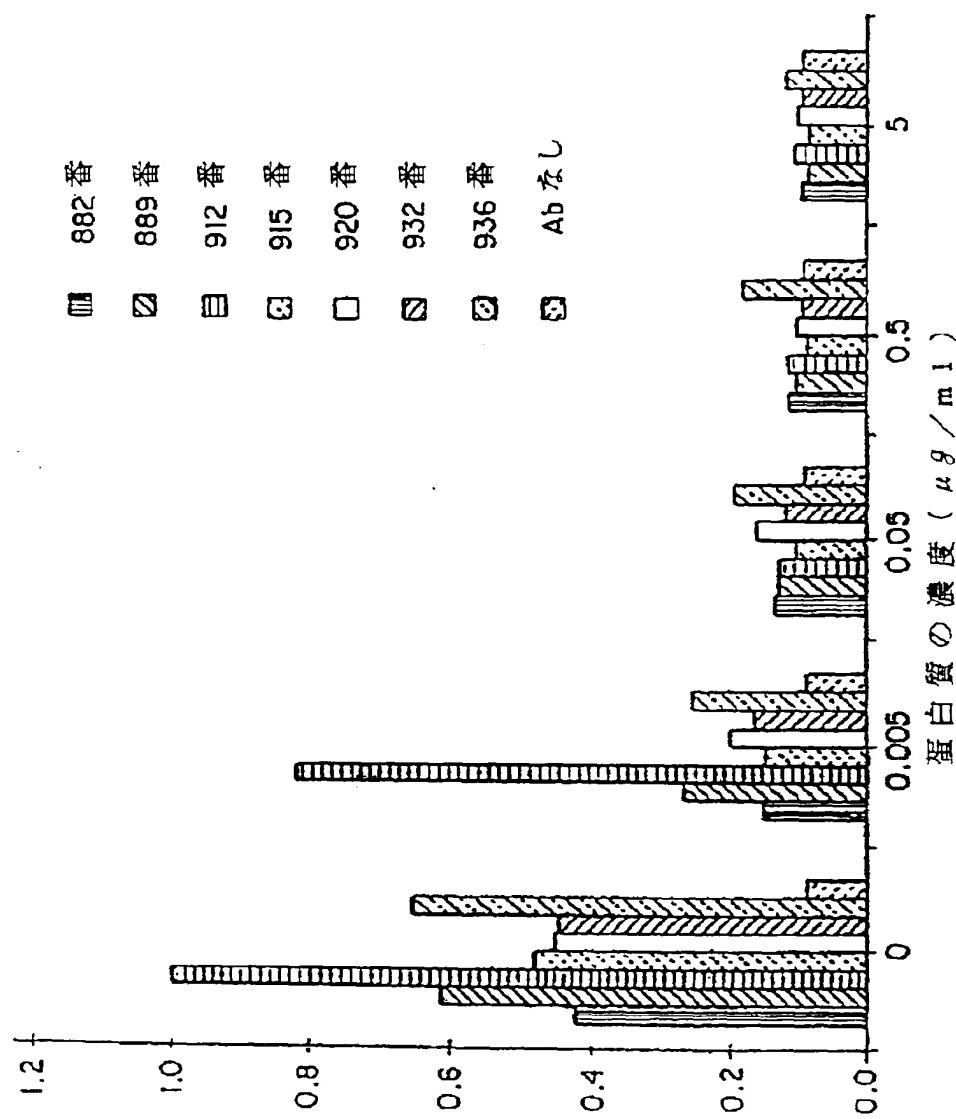
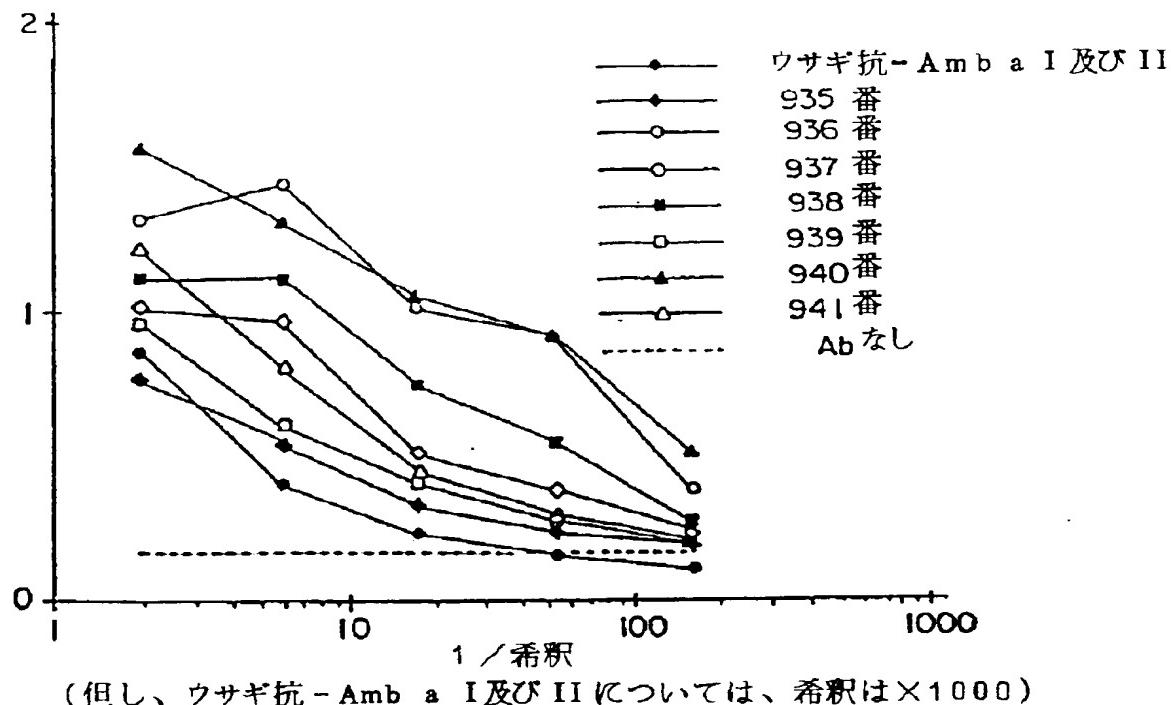
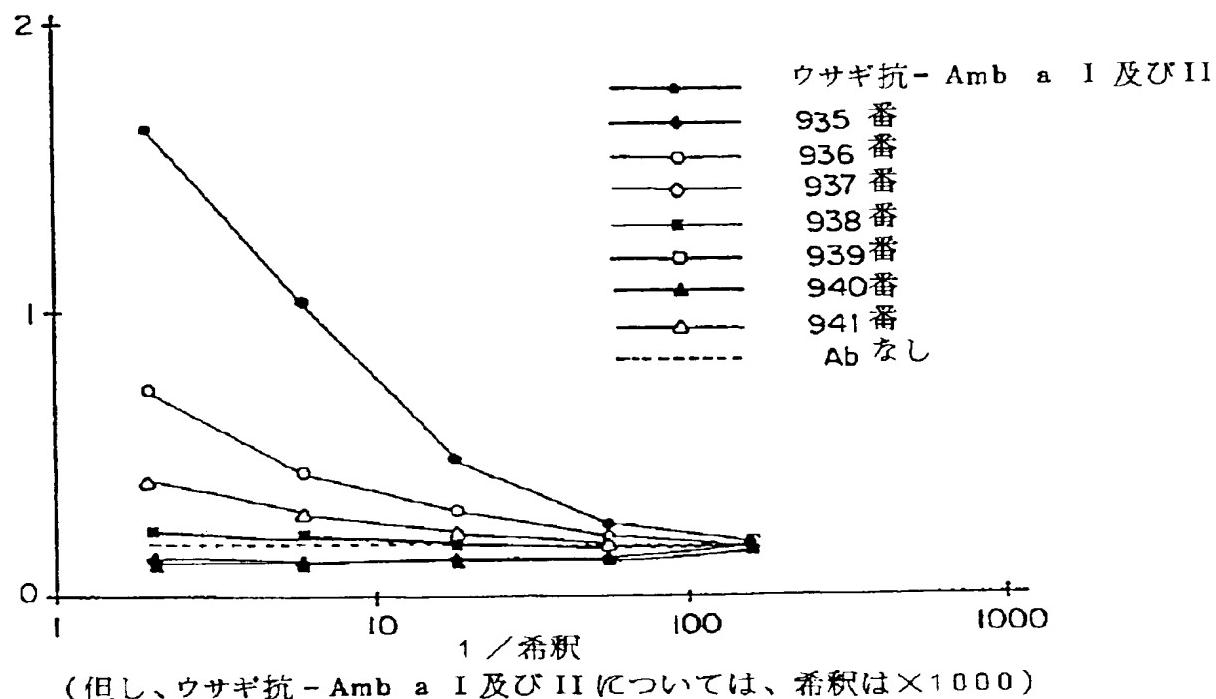


Fig. 7

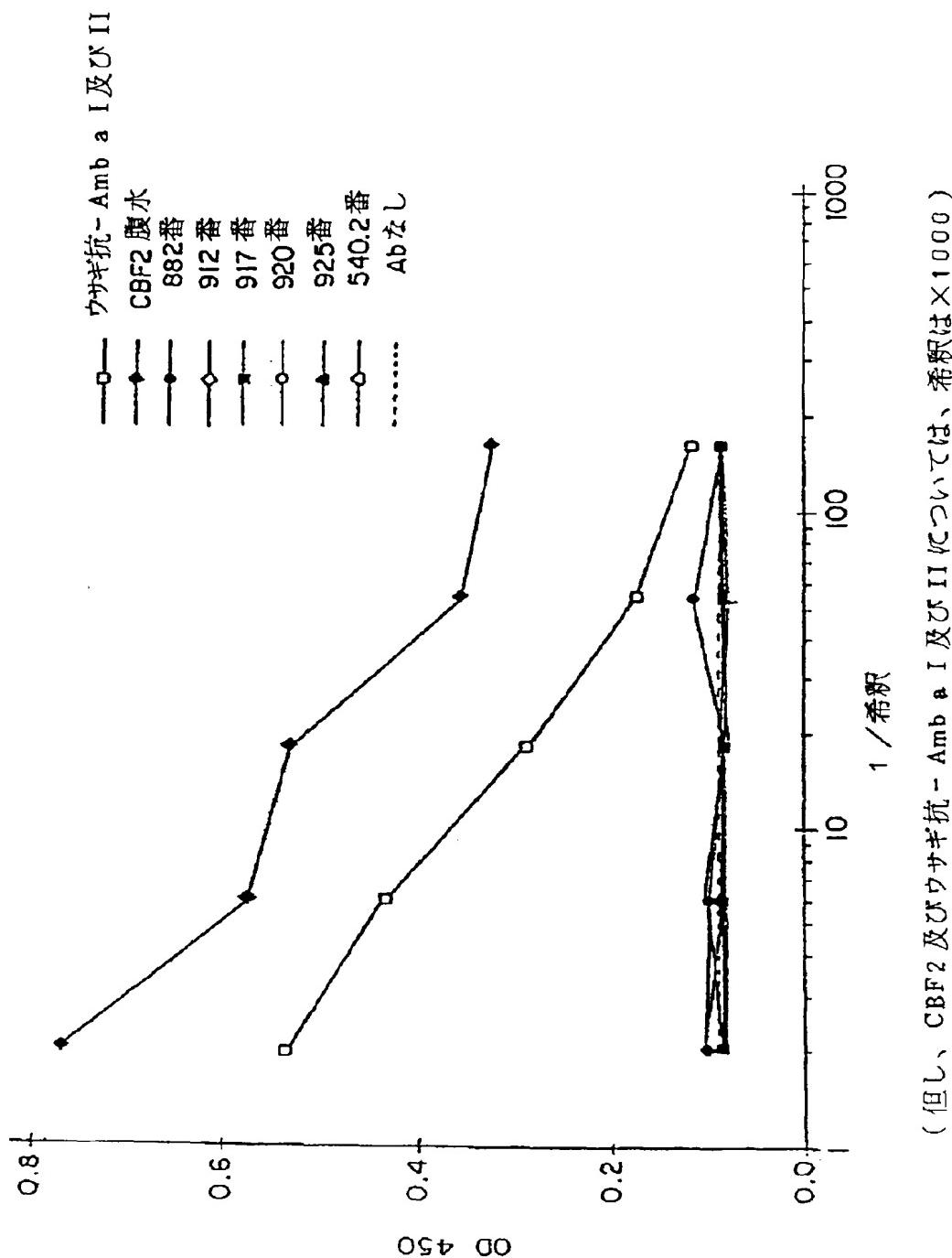
【図 8 a】

Fig. 8a

【図 8 b】

Fig. 8b

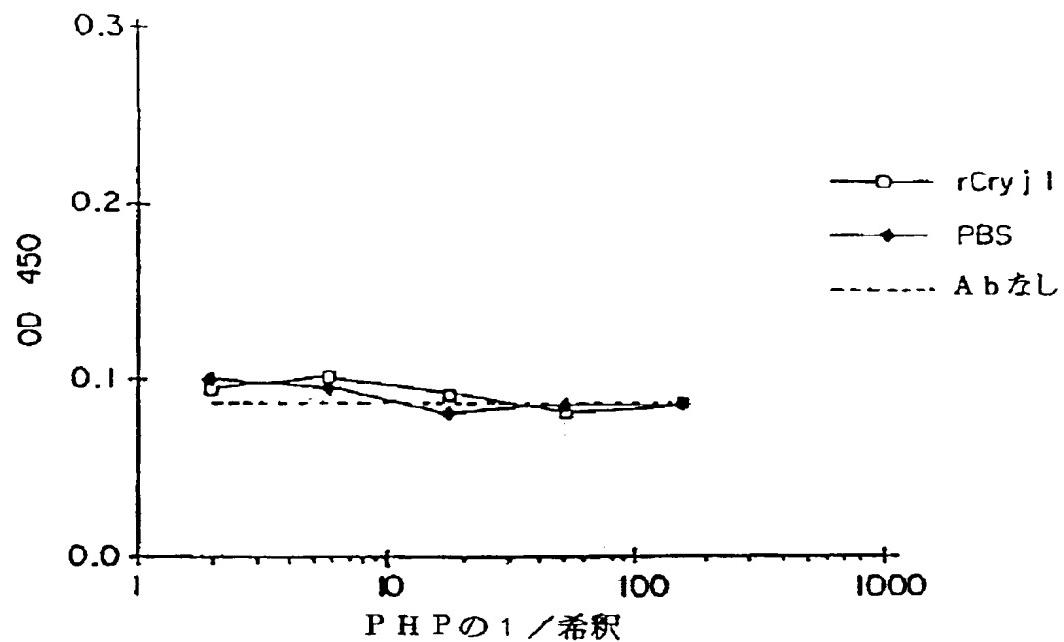
[図9]



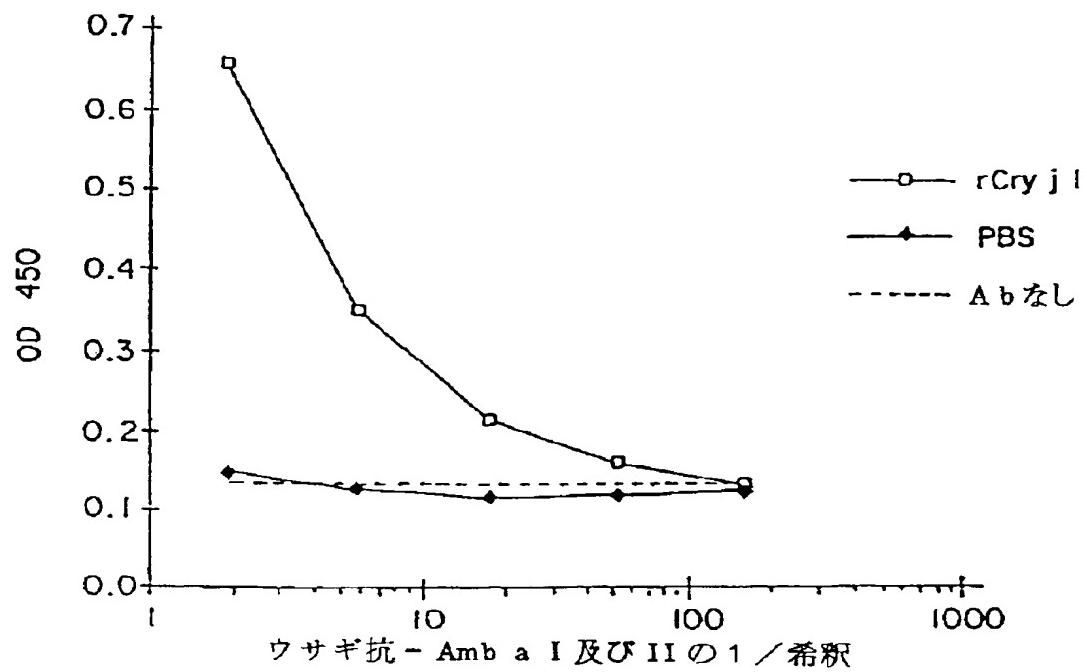
(但し、CBF2 及びウサギ抗-Amb a I 及び IIについては、希釈は×1000)

Fig. 9

【図10a】

Fig. 10a

【図10b】

Fig. 10b

【図11】

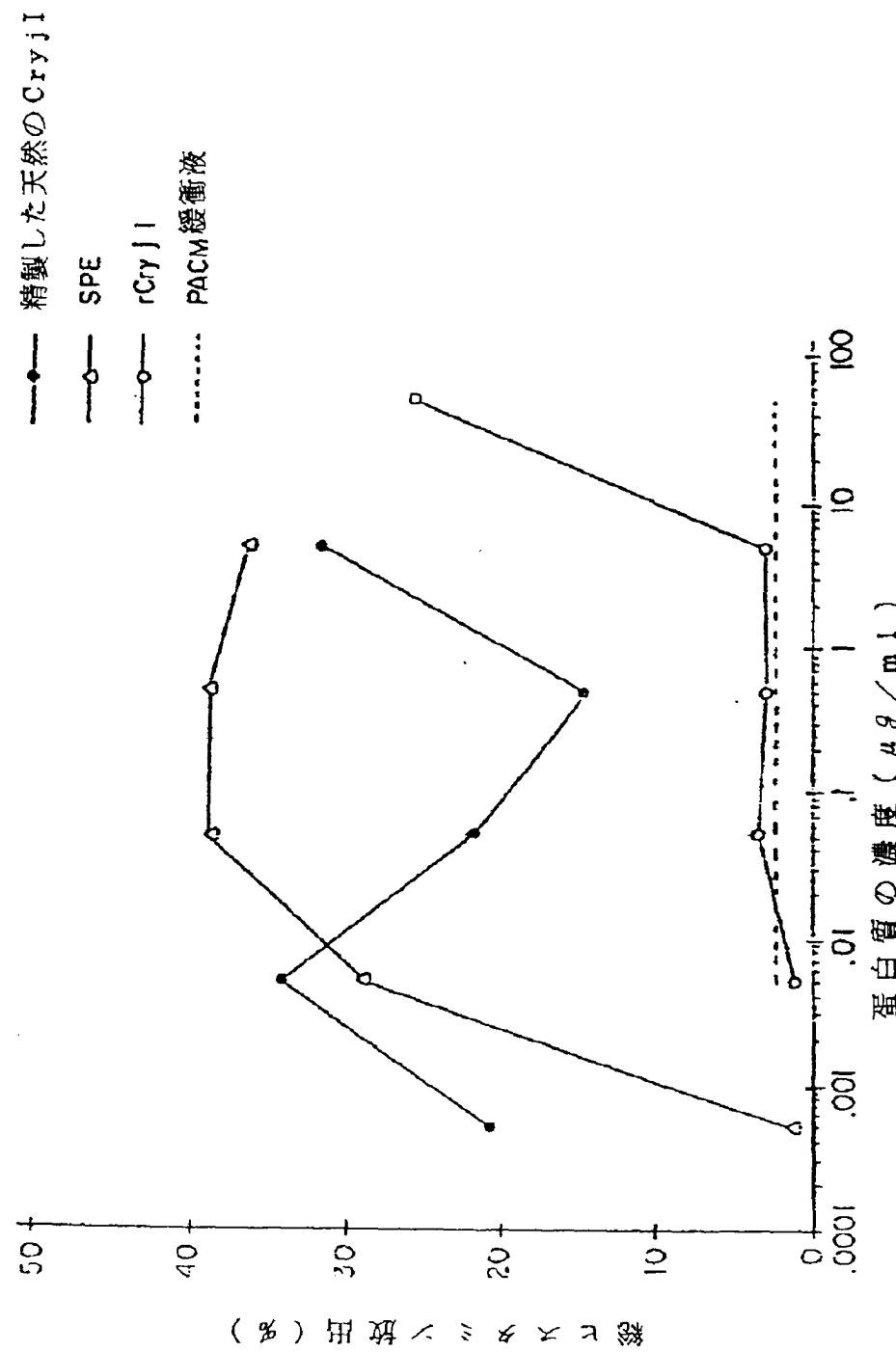
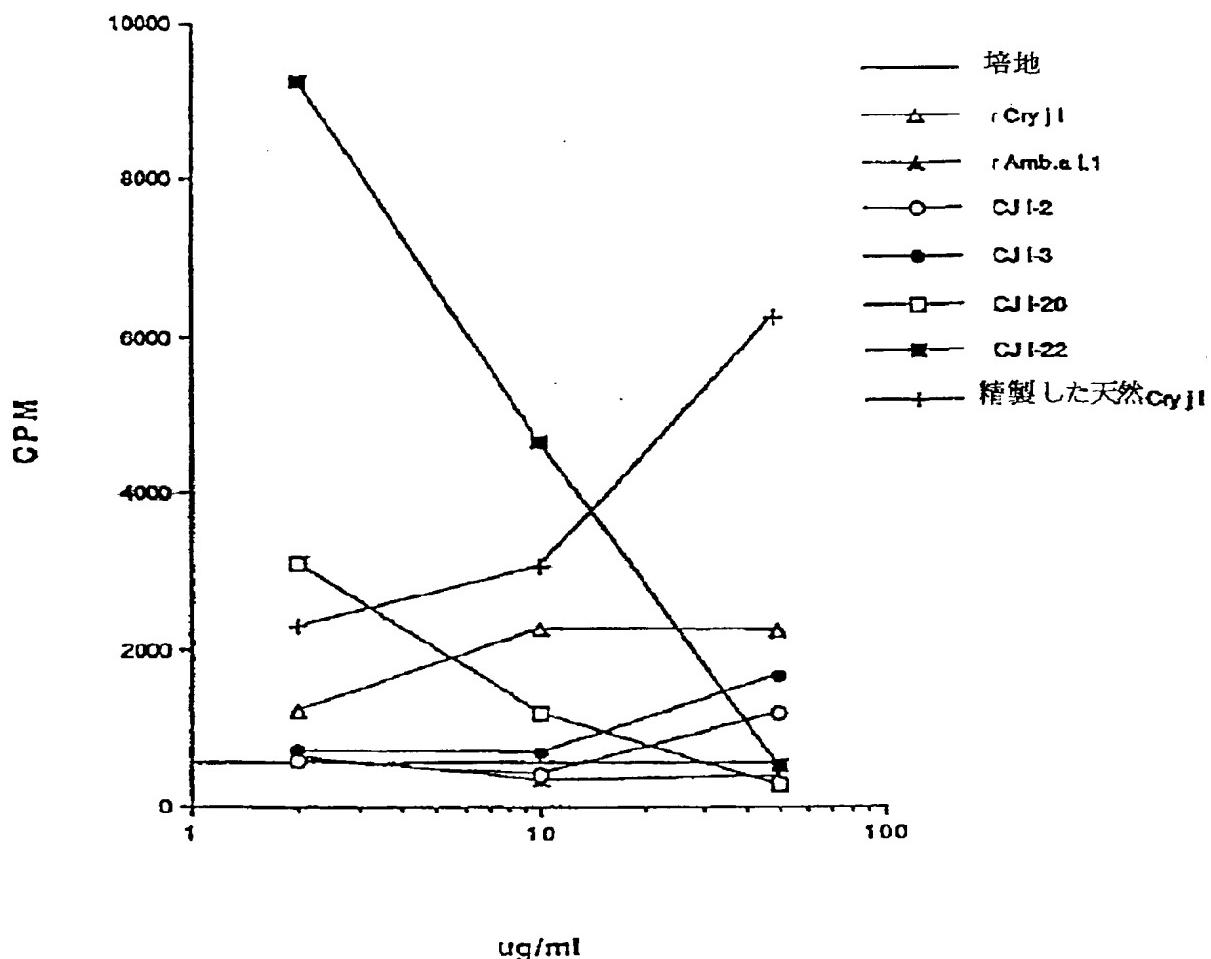


Fig. 11

【図12】

Fig. 12



[図13]

ペプチド名

CJI-1 (1-20)
 CJI-2 (11-30)
 CJI-3 (21-40)
 CJI-4 (31-50)
 CJI-5 (41-60)
 CJI-6 (51-70)
 CJI-7 (61-80)
 CJI-8 (71-90)
 CJI-9 (81-100)
 CJI-10 (91-110)
 CJI-11 (101-120)
 CJI-12 (111-130)
 CJI-13 (121-140)
 CJI-14 (131-150)
 CJI-15 (141-160)
 CJI-16 (151-170)
 CJI-17 (161-180)
 CJI-18 (171-190)
 CJI-19 (181-200)
 CJI-20 (191-210)
 CJI-21 (201-220)
 CJI-22 (211-230)
 CJI-23 (221-240)
 CJI-24 (231-250)
 CJI-25 (241-260)
 CJI-26 (251-270)
 CJI-27 (261-280)
 CJI-28 (271-290)
 CJI-29 (281-300)
 CJI-30 (291-310)
 CJI-31 (301-320)
 CJI-32 (311-330)
 CJI-33 (321-340)
 CJI-34 (331-350)
 CJI-35 (341-353)

D N P I D S C W R G D S N W A Q N R M K
 D S N W A Q N R M K L A D C A V G F G S
 L A D C A V G F G S S T M G G K G G D L
 S T M G G K G G D L Y T V T N S D D D P
 Y T V T N S D D D P V N P A P G T L R Y
 V N P A P G T L R Y G A T R D R P L W I
 G A T R D R P L W I I F S G N M N I K L
 I F S G N M N I K L K M P M Y I A G Y K
 K M P M Y I A G Y K T F D G R G A Q V Y
 T F D G R G A Q V Y I G N G G P C V F I
 I G N G G P C V F I K R V S N V I I H G
 K R V S N V I I H G L Y L Y G C S T S V
 L Y L Y G C S T S V L G N V L I N E S F
 L G N V L I N E S F G V E P V H P Q D G
 G V E P V H P Q D G D A L T L R T A T N
 D A L T L R T A T N I W I D H N S F S N
 I W I D H N S F S N S S D G L V D V T L
 S S D G L V D V T L T S T G V T I S N N
 T S T G V T I S N N L F F N H H K V M L
 L F F N H H K V M L L G H D D A Y S D D
 L G H D D A Y S D D K S M K V T V A F N
 K S M K V T V A F N Q F G P N C G Q R M
 Q F G P N C G Q R M P R A R Y G L V H V
 P R A R Y G L V H V A N N Y D P W T I
 A N N Y D P W T I Y A I G G S S N P T
 Y A I G G S S N P T I L S E G N S F T A
 I L S E G N S F T A P N E S Y K K Q V T
 P N E S Y K K Q V T I R I G C K T S S S
 I R I G C K T S S S C S N W V V W Q S T Q
 C S N W V V W Q S T Q D V F Y N G A Y F V
 D V F Y N G A Y F V S S G K Y E G G N I
 S S G K Y E G G N I Y T K K E A F N V E
 Y T K K E A F N V E N G N A T P Q L T K
 N G N A T P Q L T K N A G V L T C S L S
 N A G V L T C S L S K R C

Fig. 13

【図14】

杉花粉の概要

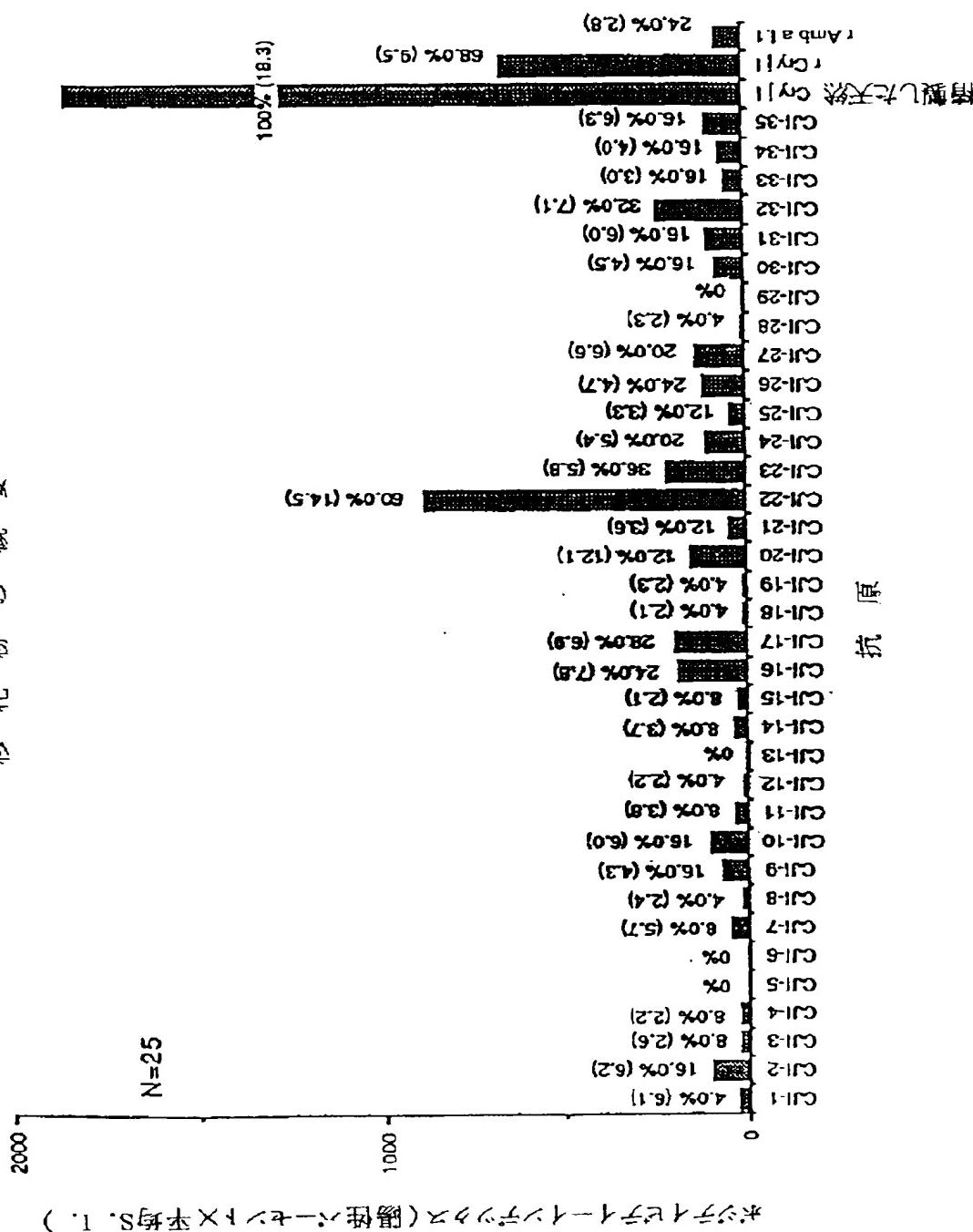
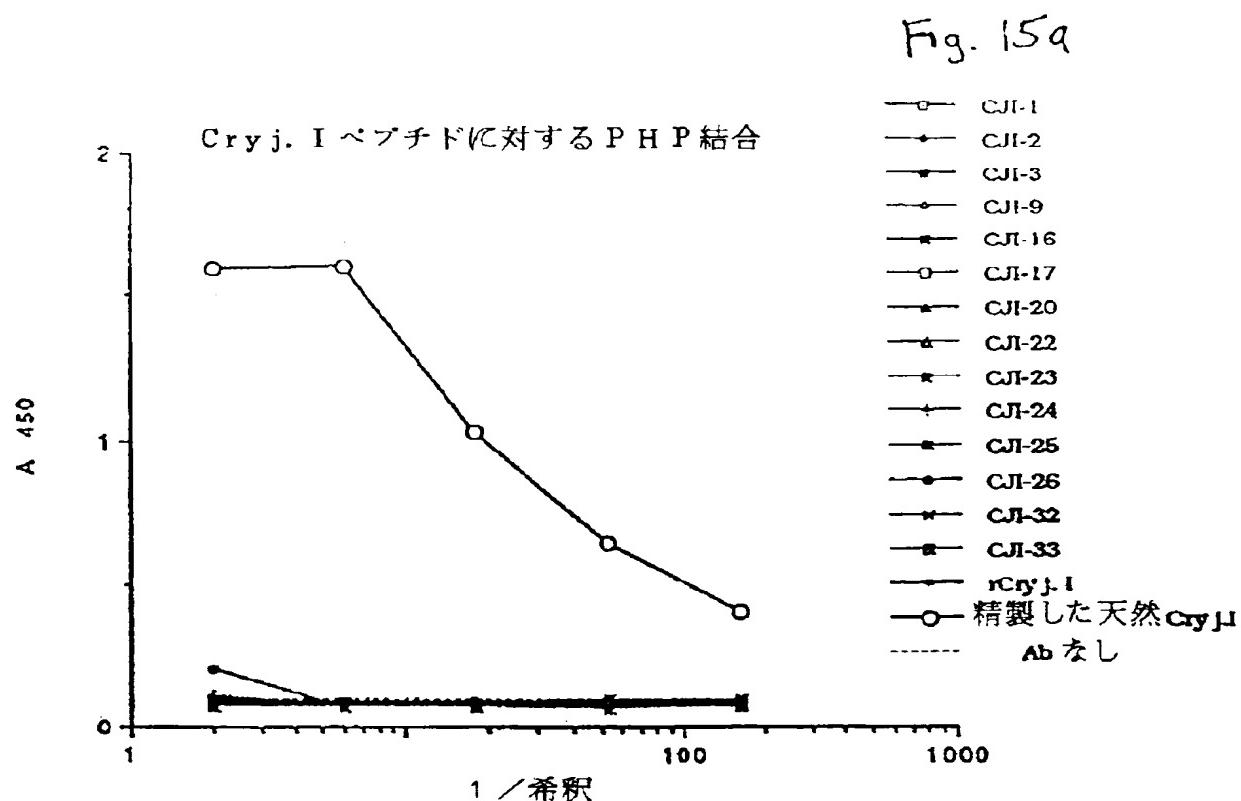
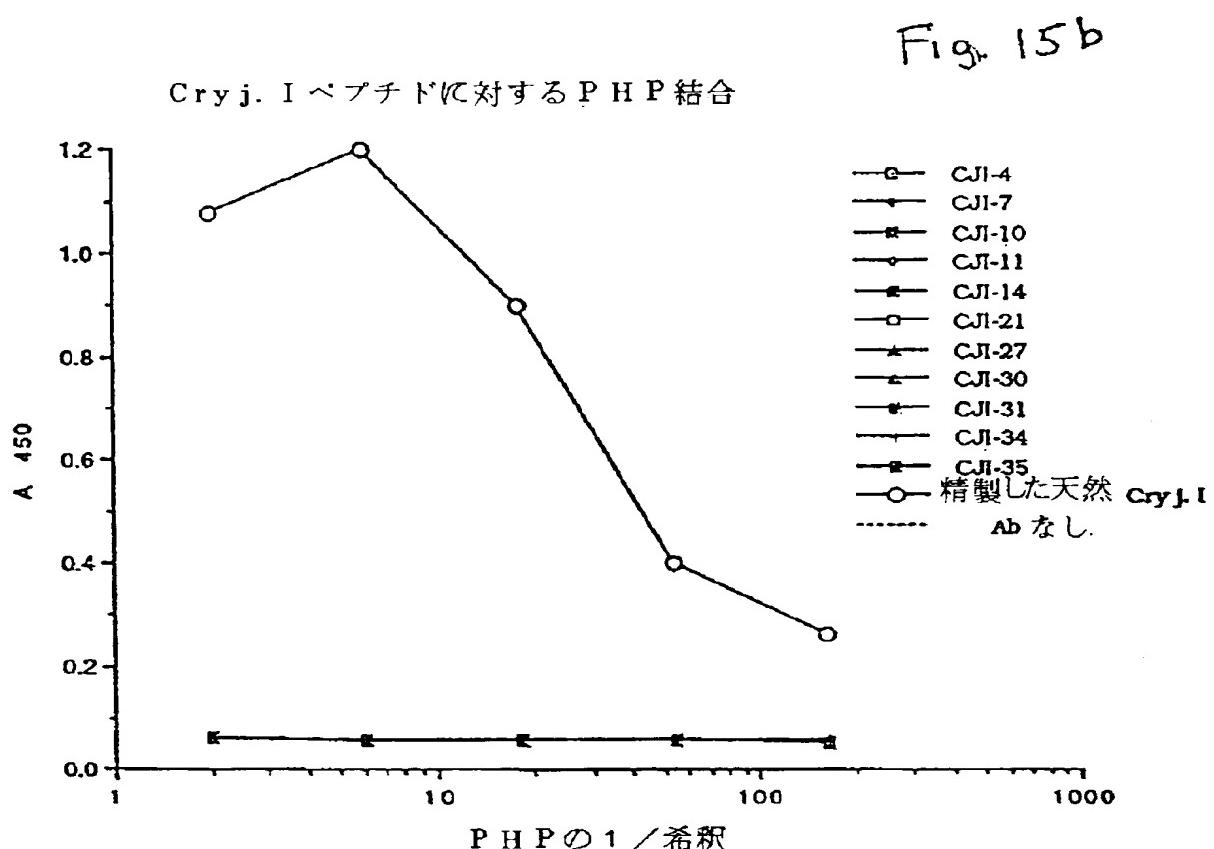


Fig. 14

【図15a】



【図15b】



[図16]

5' - A A T T C T A T T C T G A A C C C T A A A A A T G C C T T C C C C A T G C T T A A T A G C A G T C C T T G T T T T T
 M A S P C L I A V L V F
 -21 -20 -15 -10

C C T T T G T G C A A T T G T A T C T G T G A T A A T C C C A T G C A C A G G C T G C T G G A G G G A G A
 L C A I V S C Y S D N P I D S C W R G D
 -5 +1 5 10

T T C G A A C T G G A T C A A A C A G A A T G A A G C T C G C A G A C T G T G C T G T G G A T T T G G A A G C T C
 S N W D Q N R M K L A D C A V G F G S S
 15 20 25 30

C A C C A T G G C A A A G G C A G G G A G A T T T A C A C C G T C A C A A G C A C A G A T G A T A A T C C T G T
 T M G G K G G D P Y T V T S T D D N P V
 35 40 45 50

G A A T C C T A C A C C A G G A A C T T T G C G C T A T G G A G C A A C A A G G A G A A A A A G G C A C T T T G G A T C A T
 N P T P G T L R Y G A T R E K A L W I I
 55 60 65 70

T T T C T C A G A A T A T G A A T A A A G C T C A A G A T G C C T T T G T A T G T G C T G G A C A T A A G A C
 F S Q N M N T K L K M P L Y V A G H K T
 75 80 85 90

T A T T G A C G G C A G G G A G C A G A T G T T C A T C T T G G C C A A C G G G G T C C C T G T C T G T T T A T G A G
 I D G R G A D V H L G N G G P C L F M R
 95 100 105 110

Fig. 16

[図16]

GAAAGTGAGCCATGTTATTCTCCATAAGTGTGGCATATACACCGTTGTAATACGAGTGT	480
K V S H V I L H S L H I H G C N T S V L	
115 120 125 130	
GGGGATGTTTGGTAAGTCAGCTATTCGGCTCAGGCCCTGTTCAAGGATGGGA	540
G D V L V S E S I G V E P V H A Q D G D	
135 140 145 150	
GGCCATTACTATGGCCATGTTACAAATGCTTGGATTGATCATATAATTCTCTCTCGATTG	600
A I T M R H V T N A W I D H N S L S D C	
155 160 165 170	
TTCCTGATGGTCTTATCGATGTTACGGCTTGGCTCCACTGGAAATTACTATCTCCAACAATCA	660
S D G L I D V T L G S T G I T I S N N H	
175 180 185 190	
CTTCTTCAACCATCATAAAGTGTATTAGGACATGACATATGACGATGGACAA	720
F F N H H K V M L L G H D D T Y D D D K	
195 200 205 210	
ATCTATGAAAGTGACAGTGGCGTCAATCAATTGGACCTTAATGGCTGGGCATAAGAATGCC	780
S M K V T V A P N Q F G P N A G Q R M P	
215 220 225 230	

Fig. 16 cont.

[图 16]

AAGGGCACGATATGGACTTGTACATGTC	AAACAATAATTATGATCCATGGAATATA	840
R A R Y G L V H V A N N N Y D P W N I Y		
235 240 245 250		
TGCTATTGGTCAAATCCAACCATTCTGAGTGAAAGGGAAATTAGTTTCACTGCC	900	
A T G G S S N P T I L S E G N S F T A P		
255 260 265 270		
AAGTGAGAGTTACAAGAAGCAAGGTAAACCAAGCGTATAGGGTGTGAATCACC	CATCAGCTTG	960
S E S Y K Q V T K R I G C E S P S A C		
275 280 285 290		
TGGGAACCTGGGTGGAGATCTACACGAGATGCTTTATTAAATGGAGCTTATTG	TATC 1020	
A N W V W R S T R D A F I N G A Y F V S		
295 300 305 310		
ATCGGGAAACTGAAGAGACCAATATACAATAGTAATGAAAGCTTCAAAAGTTGAGAA	1080	
S G K T E E T N I Y N S N E A F K V E N		
315 320 325 330		
TGGGAATGCAGCTCCTCAATTAAACCAAAATGCTGGAGTTGTAACCTAACGCTCTCTAA	1140	
G N A A P Q L T K N A G V V T -		
335 340 345		
ATCTTGCTTATGAAACGAAATATATAG-3'		1170

Fig. 16 cont.

[図 17]

5' - CGGTATAGATTCCTATTCTGAGCCCTAAATAGGCTTCCCCATGCTTAATAGCAT 60
 M A S P C L I A
 -21 -20 -15

TCCTTGTTCCCTTGTGCAATTGATCTTGTCTGATAATCCCATAAGACAGCTGCT 120
 F L V F L C A I V S C C S D N P I D S C
 -10 -5 +1 5

GGAGGGAGATTGAACTGGGCTCAAAACAGAAATGAAAGCTCGCAGATTGGCCTGTGGAT 180
 W R G D S N W G Q N R M K L A D C A V G
 10 15 20 25 25

TGGAAGGCTCCACCATGGGGCAAAGGAGGAGATTACACCGTCACAAGGCCAGATG 240
 F G S S T M G G K G D F Y T V T S A D
 30 35 40 45 45

ATAATCCGTGAATCCTACACCGAACTTGCQCTATGGAGCAACAAAGAGAAAAGCAC 300
 D N P V N P T P G T L R Y G A T R E K A
 50 55 60 65 65

TTGGATCATTTCCTCAGAATATGAATATAAGCTCAAGATGCCCTTGTATGTTGCTG 360
 L W I I F S Q N M N I K L K M P L Y V A
 70 75 80 85 85

GACATAAGACTATGACGGCAGGGAGGAGATGTTCATCTTGGCAACGGGGTCCCTGTC 420
 G H K T I D G R G A D V H L G N G G P C
 90 95 100 105 105

Fig. 17

[図17]

TGTTTATGAGGAAGTCAGCCATGTTATTCTCCATGGTTGCATATAACACGGTTGTAATA	480
L F M R K V S H V I L H G L H I H G C N	
110 115 120 125	
CTAGTGTGTTGGGGATGTTGGTTAACGTGAGTCTATTGGGGTGGCCTGTACACCCCC	540
T S V L G D V L V S E S I G V V P V H P	
130 135 140 145	
AGCACGGAGATGGCTTACTGTGAGGACCTCTGAACATATTGGGTGACCCATAACTC	600
Q D G D A F T V R T S E H I W V D H N T	
150 155 160 165	
TCTCCAATGGCACCGACGCCCTCGACGGTTACTCTGCTTCCACTGCTGTACTATT	660
L S N G T D G L V D V T L A S T A V T I	
170 175 180 185	
CCATAACCACTCTTCGACCATGATGAAAGTGATGTTAGGACATAAGTGATTCAATTCT	720
S N N H F F D H D E V N L L G H S D S F	
190 195 200 205	
CAGATGATAAAGTGATGAAAGTCACAGTTGGCATTAAACCACCTTGGACCTAATTGTGTGC	780
S D D K V M K V T V A F N H F G P N C V	
210 215 220 225	
AACGATTGCCAAGGGCTAGATATGGACACTTTCATGTTGTTAATAATTATGAGCCAT	840
Q R L P R A R Y G H F H V V N N Y E P	
230 235 240 245	

Fig. 17 cont.

[図17]

GGGGAAATATGCCATTGGGAAAGTCTGATCCAACAATTATAAGTGAAGGGAAATAGAT	900
W G K Y A I G G S S D P T I I S E G N R	
250 255 260 265	
TTCTTGCCAAATGAATCTTATAAAAAGGAGGGTGAACAATACCGTGTGTTAAATCTA	960
F L A P N E S Y K R V T I R V G C K S	
270 275 280 285	
CAAGTTGTGATGCCATGGGAGTGGAGATCAAAGATGATGCCCTTCCTTAATGGTGCCTATT	1020
T S C D A W E W R S K D D A F L N G A Y	
290 295 300 305	
TGTTACAATCAGGCCAAGGGTATAATGGTGGAGAGGCATTCAAGGGTGAAGTGCATAATG	1080
F V Q S G K G Y N G C R A F K V E S A N	
310 315 320 325	
AGGTGCCAACATTGACTAACATGCTGGAGCATTAAATGTTACCTACCAAAACAAATGTC	1140
E V P T L T K H A G A L K C I P T K Q C	
330 335 340 345	
TGATATGAAAGTCAATCGATATAATGTTATTCTAGCTTTGAATAT	1200
V I -	
GTATAGAAAAAGAATTCAACAAATGACACTATTATAAAATTCTTAGTTATTAA	1260
GTTGGTATTAAAAAAA-3'	
	1278

Fig. 17 cont.

【図18】

CJI-41 KMPMYIAGYKTFDGRGAQVYIGNGGPCVFI
 CJI-41.1 PMYIAGYKTFDGRGAQVYIGNGGP
 CJI-41.2 YIAGYKTFDGRGAQVYIGNGGP
 CJI-41.3 KKYIAGYKTFDGRGAQVYIGNGGP

CJI-42 DALTLRTATNIWIDHNSFSNNSDGLVDVTL
 CJI-42.1 RTATNIWIDHNSFSNNSDGLVD
 CJI-42.2 KRTATNIWIDHNSFSNNSDGLVDK

CJI-43 KSMKVTVAFNQFGPNCGQRMPRARYGLHVANNYD
 CJI-43.1 KSMKVTVAFNQFGPNCGQRMPRARYGLHV
 CJI-43.6 KSMKVTVAFNQFGPNSGQRMPRARYGLHV
 CJI-43.7 KSMKVTVAFNQFGPNCGQRMPRARYGLV
 CJI-43.8 KSMKVTVAFNQFGPNSGQRMPRARYGLV
 CJI-43.9 KSMKVTVAFNQFGPNCGQRMPRARYG
 CJI-43.10 KSMKVTVAFNQFGPNSGQRMPRARYG
 CJI-43.11 KSMKVTVAFNQFGPNSGQRMPRARYGKK
 CJI-43.12 KSMKVTVAFNQFGPNCGQRMPRARYG

CJI-45 PRARYGLHVANNYDPWTIYAIGGSSNPT
 CJI-45.1 RARYGLHVANNYDPWTIYAIGGSSNP
 CJI-45.2 RARYGLHVANNYDPWTIYAIGGSS

CJI-44 DVFYNGAYFVSSGKYEGGNIYTKKEAFNVE
 CJI-44.1 NGAYFVSSGKYEGGNIYTKKEAFNVE
 CJI-44.2 NGAYFVSSGKYEGGNIYTKKEAFN
 CJI-44.3 KKNGAYFVSSGKYEGGNIYTKKEAFN

Fig. 18

【図19a】

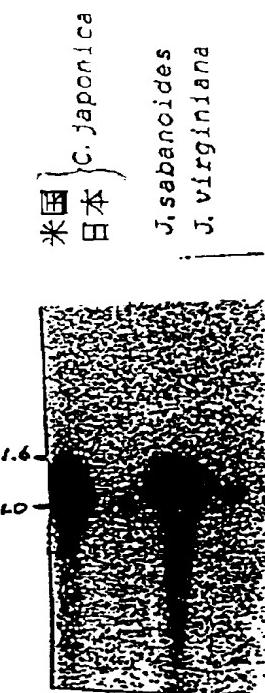


Fig 19a

【図19b】

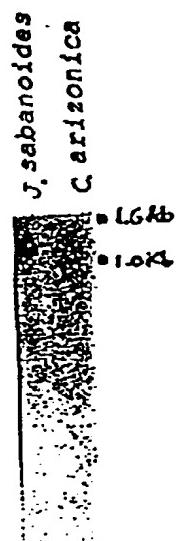


Fig 19b

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 93/00139

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC															
Int.C1. 5 C12N15/29; C07K15/10; A61K39/36; G01N33/68 C12P21/02; C12P21/08															
II. FIELDS SEARCHED Minimum Documentation Searched ¹															
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Classification System</th> <th colspan="3">Classification Symbols</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Int.C1. 5</td> <td>C12M ;</td> <td>C12P ;</td> <td>A61K ;</td> </tr> <tr> <td></td> <td>C07K</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>				Classification System	Classification Symbols			Int.C1. 5	C12M ;	C12P ;	A61K ;		C07K		
Classification System	Classification Symbols														
Int.C1. 5	C12M ;	C12P ;	A61K ;												
	C07K														
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ²															
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT³															
Category ⁴	Citation of Document, ⁵ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³													
E	WO,A,9 301 213 (IMMULOGIC PHARMACEUTICAL CORPORATION) 21 January 1993 see the whole document ----	1-122													
X	FEBS LETTERS. vol. 239, no. 2, November 1988, AMSTERDAM NL pages 329 - 332 TANIAI ET AL. 'N-terminal amino acid sequence of a major allergen of Japanese cedar pollen (Cry j I)' cited in the application see table 2 ----	1-72, 74-105, 107-115, 117-122 -/-													
<p>* Special categories of cited documents :¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)</p> <p>"D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"G" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered as novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"H" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"I" document member of the same patent family</p>															
IV. CERTIFICATION															
Date of the Actual Completion of the International Search 17 JUNE 1993	Date of Mailing of this International Search Report 28-06-1993														
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE	Signature of Authorized Officer CUPIDO M.														

PCT/US 93/00139

International Application No.

II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 13, no. 419 (C-637)(3767) 18 September 1989 & JP,A,11 56 926 (HAYASHIBARA BIOCHEM LAB INC) 20 June 1989 see abstract ----- Section Ch, Week 8742, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 87-294838 & JP,A,62 205 794 (FUJI REBIO KK) 10 September 1987 see abstract -----	1-72, 74-105, 107-115, 117-122 73, 106, 116
X		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US93/00139
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 8 of first sheet)	
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Remark : Although claims 56,70 and 72 are directed to a method of treatment of (and a diagnostic method practised on) the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition. 2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 	
<p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

US 9300139
SA 69270

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 17/06/93

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9301213	21-01-93	AU-A-	2300492	11-02-93

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁶ 識別記号 厅内整理番号 F I

C 0 7 K	16/16	
C 1 2 P	21/02	C 9282-4B
	21/08	9358-4B
G 0 1 N	33/53	Q 8310-2J
// A 6 1 K	39/395	N 9284-4C

(72)発明者 ポロック, ジョーン

アメリカ合衆国 02174 マサチューセッツ, アーリントン, ニューコーム ストリート 51

(72)発明者 ボンド, ジュリアン エフ.

アメリカ合衆国 02188 マサチューセッツ, ウェイマス, コマーシャル ストリート 294

(72)発明者 ガーマン, リチャード ディー.

アメリカ合衆国 02174 マサチューセッツ, アーリントン, フェセンデン ロード 21

(72)発明者 クウォー, メイチャン

アメリカ合衆国 01890 マサチューセッツ, ウィンチエスター, コクス ロード 5